WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК Scopus

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Международный конгресс

«Разработка и регистрация лекарственных средств»

Посвящен 10-летнему юбилею журнала

ЦФА | центр фармацевтической аналитики



Конгресс состоится 1–2 декабря 2022 года в г. Москве

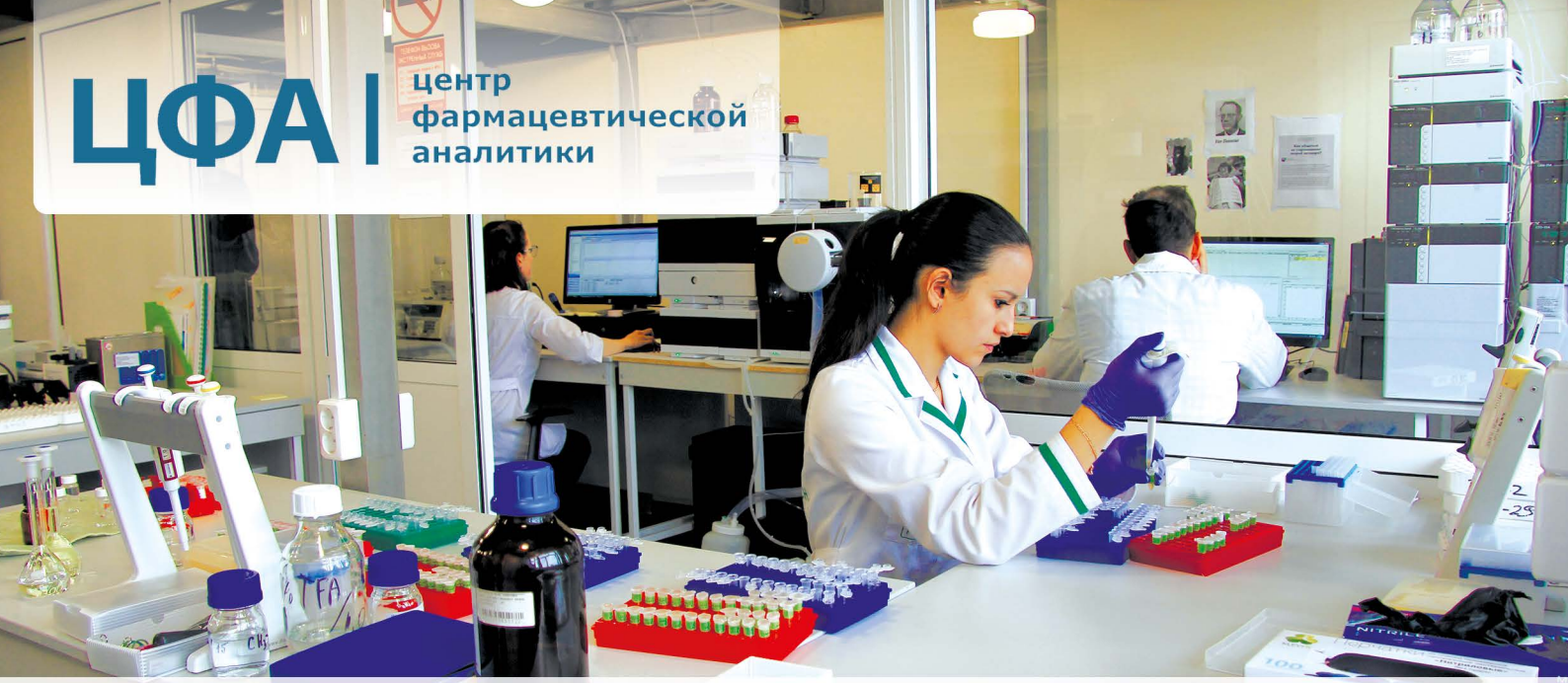
Ссылка на регистрацию http://rrls-congress.ru/
Подробнее см. 40 стр.

2022. Том 11, № 3 2022. Volume 11, No. 3

18+

Summum bonum medicinae sanitas

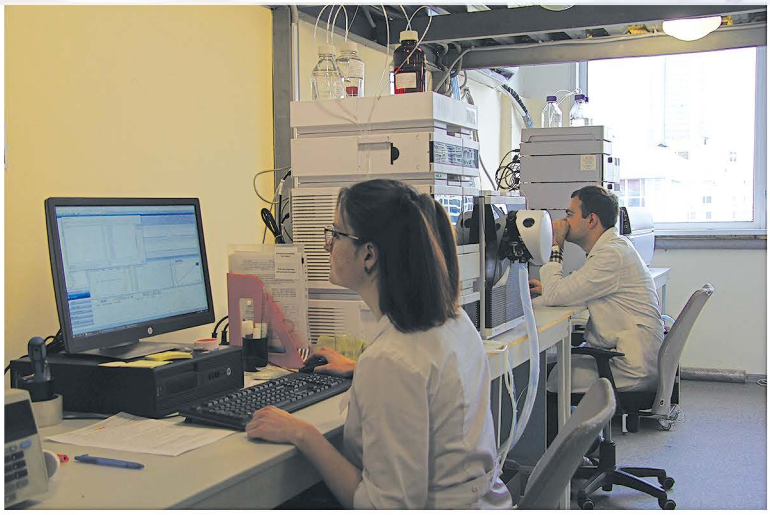
ЦФА | центр фармацевтической аналитики



ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2030)

Основными видами деятельности центра являются:

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





Область сертификации:

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

GLP сертификат

ISO сертификат

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

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

Система менеджмента ООО «ЦФА» сертифицирована по требованиям стандартов: GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра, свидетельство Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт), № Сертификата 19.1198.026 от 18 июля 2019 г. Сертификат действителен до 3 августа 2022 г.; ГОСТ Р ИСО 9001-2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации), № Сертификата 21.2427.026 от 21 декабря 2021 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2024 г.; международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet, № Сертификата 21.2428.026 от 21 декабря 2021 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2024 г. Область сертификации: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение СТКР (сравнительного теста кинетики растворения), определение противолекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

WWW.PHARMJOURNAL.RU

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2022. Том 11, № 3

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2022. Volume 11, No. 3

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

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

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

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

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

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

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

Джупарова И. А., доцент, д. фарм. н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации, медицинского и фармацевтического товароведения ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, 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

Каракулова Е. В., д. фарм. н., профессор кафедры управления и экономики фармации ФБГОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

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

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

Лаврентьева Л. И., доцент, д. фарм. н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации ФГБОУ ВО Ярославский государственный медицинский университет Минздрава России, Ярославль, 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

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

Сливкин А. И., проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологи 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

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

Ташлицкий В. Н., к. х. н., старший научный сотрудник кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Тринеева О. В., д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологи ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Чучалин В. С., д. фарм. н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Эпштейн Н. А., к. х. н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

Учредители печатной версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3 **Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)** Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации** Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
Учредители онлайн версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
Издатель	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
Директор журнала	Кульджанова Н. В.
Заведующий редакцией	Михайлова Н. С.
Основан	Журнал издается с ноября 2012 г.
Периодичность	4 выпуска в год
Префикс DOI	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Адрес редакции	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Адрес типографии	**ООО «МАКС ПРЕСС»** Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
Копирайт	© Разработка и регистрация лекарственных средств, 2022
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
Тираж	999 экземпляров
Цена	Свободная

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

Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal **"Drug Development & Registration"** (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal "Drug development & registration" (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization.

The first section is devoted to the research and development of new medicines.

The second section one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development.

The third section describes analytical quality control methods.

The fourth section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies.

The fifth section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

Irina A. Dzhuparova, as. Dr. of Sci., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 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

Elena V. Karakulova, Dr. of Sci., Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

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

Vladimir A. Kurkin, Dr. of Sci., Samara State Medical University, Samara, Russia

Larisa I. Lavrenteva, as. Dr. of Sci., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

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

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

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

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), FSBI "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Olga V. Trineeva, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

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

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

Print version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia **I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)** Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia **Siberian State Medical University** Address: 2, Moscowskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Publisher	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
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	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	**LLC "MAX PRESS"** 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, 2022
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Circulation	999 copies
Price	Free

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

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции 10
Мероприятия 40

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Риск-ориентированный подход при получении и анализе свойств суспензионных культур клеток шлемника байкальского
А. А. Шмарова, Н. С. Пивоварова, О. Н. Абросимова 47

Исследование гиполипидемической активности полисахарида L-рамнопиранозил-6-*О*-метил-галактуронана при комбинированном применении с ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы и абсорбции холестерола
Е. Е. Буйко, В. В. Иванов, О. А. Кайдаш, О. Ю. Рыбалкина, Е. А. Киселева, С. В. Кривощеков, Т. Л. Киселева, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов 57

Роль сигнального каскада IKK-2/NF-κB в активации перитонеальных макрофагов гуминовыми кислотами торфа
Е. С. Трофимова, М. В. Зыкова, А. А. Лигачева, М. Г. Данилец, Е. Ю. Шерстобоев, А. В. Цупко, Д. А. Михалёв, М. В. Белоусов 64

Антитромботическая активность производного индолинона – стимулятора растворимой гуанилатциклазы
В. В. Быков, А. В. Быкова, В. И. Смольякова, Г. А. Чернышева, О. И. Алиев, А. М. Анищенко, А. В. Сидехменова, С. А. Станкевич, В. А. Хазанов, А. И. Венгеровский 70

Фармацевтическая технология

Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия
М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина, О. К. Павельева, Е. И. Каленикова 75

Изучение влияния технологических методов на растворение рентгеноаморфной системы эфавиренз-мезопористый носитель
С. А. Золотов, Н. Б. Демина, Е. С. Пономарев, И. А. Даин, А. С. Золотова 84

Условия экстрагирования сапонинов *Solidágo virgáurea*
М. У. Сергалиева, А. В. Самотруев, А. А. Цибизова 91

Конструкция иммунолипосом (обзор)
М. В. Дмитриева, И. В. Ярош, Е. В. Санарова, А. В. Ланцова, О. Л. Орлова 97

Разработка диспергируемых в полости рта таблеток ибупрофена на основе полимер-лекарственного комплекса
В. Р. Тимергалиева, Р. Р. Хуснутдинов, Р. Р. Мусина, Е. С. Елизарова, Р. Р. Алсынбаев, Ш. Ф. Насибуллин, Р. И. Мустафин 113

Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях
У. В. Ногаева, А. А. Наумова, А. Г. Новиньков, Е. В. Флисюк, М. А. Буракова, А. Н. Шиков, О. Н. Абросимова 121

Разработка состава комбинированных карандашей лекарственных для лечения стоматологических заболеваний
И. В. Алексеева, Т. Е. Рюмина, В. В. Новикова, А. Л. Голованенко, Ю. М. Коцур, Л. В. Шигарова 130

Методы анализа лекарственных средств

Нормирование остаточных фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье (обзор)
О. В. Фатеенкова, А. М. Савватеев, В. Л. Белобородов, И. В. Гравель 137

Актуальные аспекты контроля качества и стандартизации лекарственных препаратов элеутерококка колючего
В. А. Куркин, Т. К. Рязанова 152

Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сырья валериан сомнительной и волжской
О. А. Колосова, О. В. Тринеева 162

Исследование корневищ и корней родиолы розовой методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии
Н. В. Скляревская, Ю. С. Алексеева, А. О. Понкратова, Е. В. Жохова 173

Скрининг липофильных фракций ботанических форм Сельдерея пахучего методом ГХ/МС
Е. С. Сурбеева, Н. Ю. Сипкина, С. И. Комова, У. А. Ефремова, И. И. Тернинко 181

Доклинические и клинические исследования

Изучение кишечной проницаемости на модели Caco-2 производного фенилтетрагидрохинолиндиона с $TRPA_1$-антагонистической активностью
Н. В. Пятигорская, А. Д. Кравченко 195

Разработка способа и схемы применения живой рекомбинантной коклюшной вакцины «ГамЖВК». Безопасность и переносимость двукратной интраназальной вакцинации здоровыми взрослыми добровольцами
Г. И. Каратаев, А. Ю. Медкова, Е. Г. Сёмин, Л. Н. Синяшина, Р. А. Сюндюкова, С. В. Куликов, Н. А. Снегирёва, И. Н. Чернышова, М. В. Гаврилова, К. К. Бушкова, А. А. Лиджиева, Л. В. Колобухина, И. С. Кружкова, Л. Н. Меркулова, М. Г. Русанова, М. В. Базарова, Н. А. Антипят, С. В. Сметанина, Е. А. Смолярчук, И. Н. Дьяков 202

Исследование эффективности действия препаратов на основе молекулярных комплексов аденозин-полимер на модели термического ожога
Е. Д. Семивеличенко, А. А. Ермолаева, В. В. Пономаренко, А. В. Новоселов, Г. А. Плиско, Д. Ю. Ивкин, В. Г. Антонов, В. Е. Карев, И. А. Титович, А. В. Ерёмин 209

Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ
Т. Н. Комаров, П. К. Карнакова, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин, К. Я. Заславская, П. А. Белый 220

Регуляторные вопросы

Вопросы национальной лекарственной безопасности при формировании резерва антибактериальных средств, предназначенного для ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций
Л. Ю. Черникова, В. Н. Дмитрук, Н. Л. Денисов, Э. Г. Морозова, А. В. Ратькин, Е. В. Каракулова 231

Некролог 238

CONTENTS

Introduction 10
Events 40

Research and development of new drug products

Risk-based Approach in Obtaining and Analysing the Characteristics of Baikal Skullcap Suspension Cultures
Alexandra A. Shmarova, Nadezhda S. Pivovarova, Olesya N. Abrosimova 47

Hypolipidemic Activity of the Polysaccharide L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galacturonan in Combined Administration with HMG-CoA Reductase and Cholesterol Absorption Inhibitors
Evgeny E. Buyko, Vladimir V. Ivanov, Olga A. Kaidash, Olga Yu. Rybalkina, Elena A. Kiseleva, Sergey V. Krivoshchekov, Tatiana L. Kiseleva, Artem M. Guriev, Mikhail V. Belousov 57

The Role of IKK-2/NF-κB Signaling Cascade in the Activation of Peritoneal Macrophages by Humic Acids of Peat
Evgenia S. Trofimova, Maria V. Zykova, Anastasia A. Ligacheva, Marina G. Danilets, Evgenii Yu. Sherstoboev, Andrey V. Tsupko, Dmitrii A. Mikhalev, Mikhail V. Belousov 64

Antithrombotic Activity of an Indolinone Derivative – a Soluble Guanylate Cyclase Stimulator
Vladimir V. Bykov, Arina V. Bykova, Vera I. Smolyakova, Galina A. Chernysheva, Oleg I. Alyev, Anna M. Anishenko, Anastasia V. Sidekhmenova, Sergey A. Stankevich, Veniamin A. Khazanov, Aleksander I. Vengerovsky 70

Pharmaceutical Technology

Natural Deep Eutectic Solvents as Alternative Flavonoid Extractants from the Sedative Plant Composition
Marina A. Dzhavakhyan, Yulia E. Prozhogina, Olesya K. Pavelieva, Elena I. Kalenikova 75

Study of the Technological Methods Effect on Dissolution of the X-ray Amorphous Efavirenz-mesoporous Carrier System
Sergey A. Zolotov, Natalia B. Demina, Evgenii S. Ponomarev, Igor A. Dain, Anna S. Zolotova 84

Conditions for Extraction of Saponins *Solidágo virgáurea*
Mariyam U. Sergalieva, Andrei V. Samotruev, Aleksandra A. Tsibizova 91

The Construction of Immunoliposomes (Review)
Maria V. Dmitrieva, Ilya V. Yarosh, Ekaterina V. Sanarova, Anna V. Lantsova, Olga L. Orlova 97

Development of Orodispersible Ibuprofen Tablets Based on a Polymer-drug Complex
Venera R. Timergalieva, Ramil R. Khusnutdinov, Regina R. Musina, Elizaveta S. Elizarova, Radmir R. Alsynbaev, Shamil F. Nasibullin, Rouslan I. Moustafine 113

Comparative Study of Rheological Properties of Gels and Creams on Different Carrier Bases
Uljana V. Nogaeva, Alyona A. Naumova, Alexander G. Novinkov, Elena V. Flisyuk, Marina A. Burakova, Alexander N. Shikov, Olesya N. Abrosimova 121

Development of the Composition of Combined Medicinal Pencils for the Treatment of Dental Diseases
Irina V. Alekseeva, Tatyana E. Ryumina, Valentina V. Novikova, Anna L. Golovanenko, Yulia M. Kotsur, Larisa V. Shigarova 130

Analytical Methods

Rationing of Residual Organophosphate Pesticides in Herbal Substances (Review)
Olga V. Fateenkova, Alexey M. Savvateev, Vladimir L. Beloborodov, Irina V. Gravel 137

Current aspects of Quality Control and Standardization of *Eleutherococcus senticosus* Medicines
Vladimir A. Kurkin, Tatyana K. Ryazanova 152

Studying the Possibility of Application ir Spectroscopy for Raw Material Identification *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L.
Olga A. Kolosova, Olga V. Trineeva 162

Research of *Rhodiola rosea* Rhizomes and Roots Using High Performance Thin Layer Chromatography
Nelli V. Sklyarevskaya, Yulia S. Alexeeva, Anastasiia O. Ponkratova, Elena V. Zhokhova 173

Screening of Lipophilic Fractions of Botanical Forms of Celery by GC/MS Method
Elizaveta S. Surbeeva, Nadezhda Y. Sipkina, Sophia I. Komova, Ulyana A. Efremova, Inna I. Terninko 181

Preclinical and clinical study

Caco-2 Intestinal Permeability Study of Phenyltetrahydroquinolinedione Derivative – $TRPA_1$ Antagonist
Natalya V. Pyatigorskaya, Aleksey D. Kravchenko 195

Development of a Method and a Scheme for the Use of a Live Recombinant Vaccine "GamLPV". Safety and Tolerability of Double Intranasal Vaccination of Healthy Adult Volunteers
Gennadiy I. Karataev, Alisa Yu. Medkova, Evgeniy G. Semin, Ludmila N. Sinyashina, Rezida A. Sioundioukova, Sergey V. Kulikov, Nadezhda A. Snegireva, Irina N. Chernishova, Marina V. Gavrilova, Kristina K. Bushkova, Alevtina A. Lidzhieva, Ludmila V. Kolobukhina, Irina S. Kruzhkova, Ludmila N. Merkulova, Marina G. Rusanova, Marina V. Bazarova, Natalia A. Antipyat, Svetlana V. Smetanina, Elena A. Smolyarchuk, Ilya N. Dyakov 202

Study of the Effectiveness of Drugs Based on Molecular Complexes of Adenosine-polymer on the Model of Thermal Burn
Evgeniy D. Semivelichenko, Anastasia A. Ermolaeva, Veronika V. Ponomarenko, Anton V. Novoselov, Grigoriy A. Plisko, Dmitry Yu. Ivkin, Victor G. Antonov, Vadim E. Karev, Irina A. Titovich, Alexei V. Eremin 209

Development and Validation of HPLC-UV Method for the Determination of Favipiravir in Human Plasma
Timofey N. Komarov, Polina K. Karnakova, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Natalia S. Bagaeva, Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely 220

Regulatory Issues

Issues of National Drug Security in Formation of a Reserve of Antibacterial Agents Intended to Eliminate Medical and Sanitary Consequences of Emergencies
Larisa Yu. Chernikova, Vadim N. Dmitruk, Nikolay L. Denisov, Elvira G. Morozova, Alexander V. Ratkin, Elena V. Karakulova 231

Obituary 238

Редакционная статья / Editorial article

Ежегодная конференция «Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств» прошла в Москве 17 июня

Летнее мероприятие было посвящено обсуждению отдельных аспектов разработки, исследований и регистрации биотехнологических лекарственных средств. В рамках конференции мы поговорили про доклинические, клинические исследования, производство различных групп биотехнологических лекарственных препаратов, в т. ч. гепарины, моноклональные антитела, пептидные препараты. Организаторы конференции – ООО «Центр фармацевтической аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Annual Conference "Drug Development and Registration of Biotechnological Drugs" was Held in Moscow on June 17

The summer event was devoted to the discussion of certain aspects of the development, research and registration of biotechnological drugs. During the conference, we have discussed preclinical, clinical research, production of various groups of biotechnological drugs, including heparins, monoclonal antibodies, peptide drugs. The organizers of the conference are the LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" and the scientific and production journal "Drug development & registration".



Мероприятие проходило в живом формате в Технопарке Московского центра инновационных технологий в здравоохранении. Среди посетителей мероприятия сотрудники отделов разработки ЛС фармпредприятий, сотрудники отделов регистрации фармацевтических компаний, сотрудники контрактно-исследовательских организаций, сотрудники научных и образовательных учреждений.

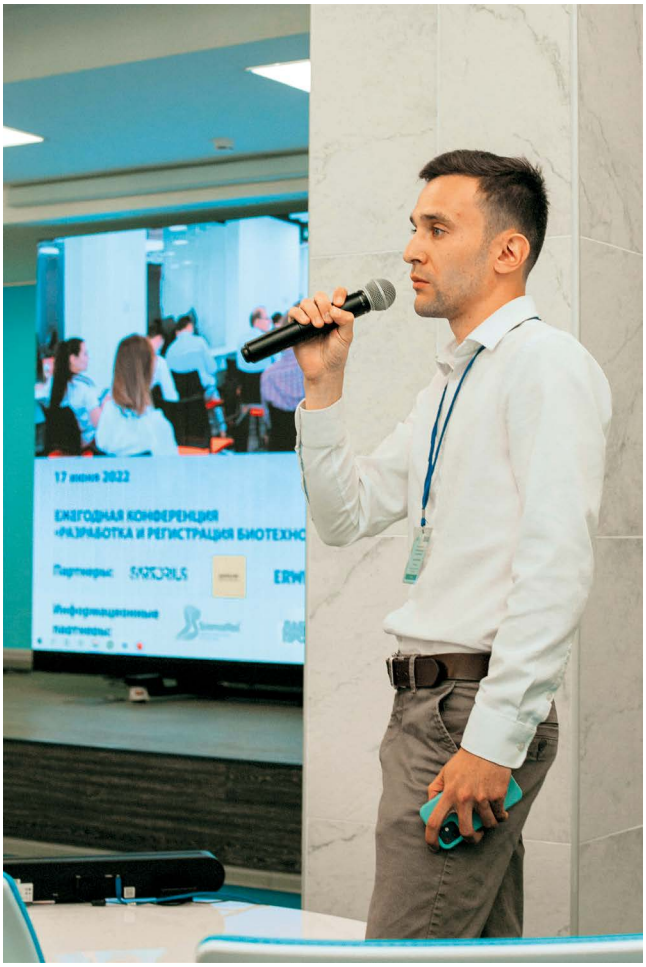
Всего конференцию посетило около 130 человек. Слушатели отметили высокий уровень организации мероприятия, высокую профессиональную ценность представленного материала и выразили желание посещать подобные мероприятия в дальнейшем.

Программа конференции традиционно состояла из трех секций. В рамках первой секции были представлены новейшие решения, применяемые на этапе разработки и исследований ЛС.

Первый доклад был представлен специалистом компании **Sartorius Bioanalytics**, который рассказал об использовании технологической платформы безмаркерной интерферометрии биослоя Octet BLI для характеристики критически важных молекул в процессе разработки лекарств.

Системы Sartorius Octet® сконструированы с использованием оптической технологии безмаркерной интерферометрии биослоя (BLI) и обеспечивают быстрый и надежный анализ белка без использования микрофлюидных технологий.

Платформа Octet® представляет собой комплексный инструмент для анализа и определения характеристик молекулярных взаимодействий, таких как взаимодействия «белок-белок» или «белок-препарат». Она обеспечивает огромное разнообразие областей применения в задачах, выполняемых на различных



Глеб Барсуков, «Сарториус РУС»

стадиях разработки биологических препаратов – от раннего отбора до валидации и производства.

Новейшее предложение в линейке систем Octet®, серия Octet® R, включает три различные конфигурации:

- Octet® R2 с двумя каналами;
- Octet® R4 с четырьмя каналами;
- Octet® R8 с восемью каналами.

Наряду с высокой чувствительностью и производительностью, обеспечиваемыми платформой Octet®, эта новая серия поддерживает возможность модернизации на месте для обеспечения максимальной гибкости и защиты ваших инвестиций в будущем. Увеличивать пропускную способность вашей системы можно по мере необходимости.

Системы серии Octet® R выступают в качестве аналитической «рабочей лошадки» благодаря широкому спектру применений и обеспечению соответствия различным требованиям к технологическому процессу.

Несмотря на то, что все три системы демонстрируют сопоставимую производительность, система Octet® R2 лучше всего подходит для лабораторных работ и для этапов технологического процесса с низкими требованиями к пропускной способности.

Система Octet® R4 подходит для лабораторий с умеренной пропускной способностью.

Системы Octet® R8 лучше всего подходят для лабораторий, работающих над высокопроизводительным анализом биомолекул, или в рамках этапов технологического процесса, требующих параллельной обработки большого количества образцов.

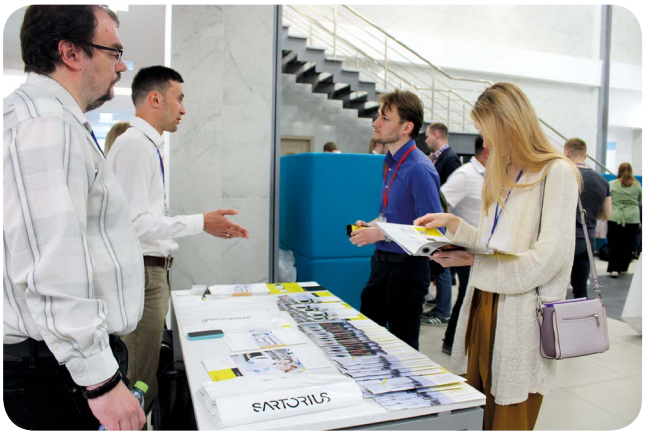
Павел Гнеденков, специалист по технологиям ферментации и одноразовым технологиям **«Сарториус Стедим РУС»**, рассказал про контрактную разработку комплексных решений для производства белков на основе линий CHO.



Павел Гнеденков, «Сарториус Стедим РУС»

Продукты, получаемые на основе клеток эукариот, являются одними из самых маржинальных фармацевтических препаратов на сегодняшний день и имеют очень хорошие рыночные перспективы. Разработка методов получения таких препаратов является достаточно сложной технической задачей и содержит большое количество подводных камней. С одной стороны, проведение разработки на основе самостоятельно полученных клеточных линий CHO позволяет получать эксклюзивные права на клеточную линию и продукт. А поскольку у разработчика при этом подходе остаются экспериментальные записи обо всем процессе, в случае возникновения сложностей, процесс разработки всегда можно откатить к более ранней стадии и попробовать иной подход или иной клон. С другой стороны, подобная разработка требует наличия полностью укомплектованной клеточной и аналитической лаборатории, длительного времени и значительных трудозатрат, при этом результат зачастую непредсказуем.

Приобретение готового технологического процесса (вместе с клеточной линией) позволяет гарантировать работоспособность процесса и получить доступ к реальным технологическим протоколам. Но при этом, как правило, такой подход требует наибольших финансовых затрат, а отсутствие альтернативных клонов и данных о разработке может создать

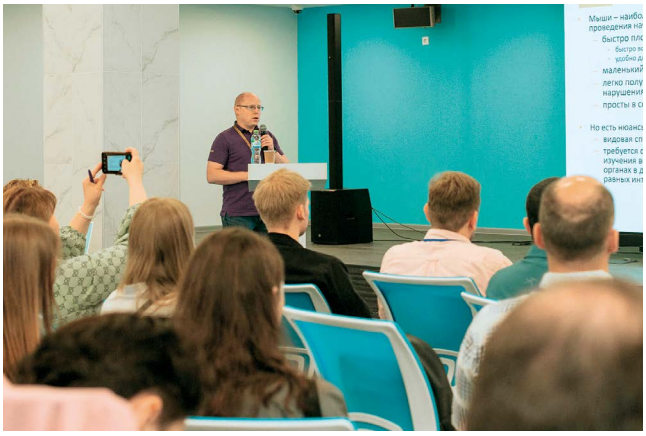


сложности в том случае, если процесс все же придется модифицировать.

Контрактные исследования позволяют отчасти совместить преимущества обоих подходов и нивелировать их недостатки. Так, сервис разработки экспрессионных систем Sartorius (ранее принадлежал Cellca) использует свою экспрессионную систему на основе линии DG44. Большой опыт работы с этой линией (более 120 завершенных проектов) позволяет с высокой долей вероятности утверждать, что базовая продуктивность (минимум 3 г/л целевого белка) будет достигнута в кратчайшие сроки (менее 6 месяцев). При этом сопутствующие сервисы позволяют провести характеризацию клеточного банка и доказать биоаналогичность препарата. Более того, документация по разработке передается заказчику, что позволяет, в случае необходимости, доработать процесс на месте. А отбор из пула трех клонов вместо одного позволяет исключить возможные проблемы на более поздних стадиях.

Ирхин Сергей, руководитель направления клеточный и белковый анализ **ООО «Диаэм»**, представил доклад на тему «Применение технологии прижизненного имиджинга для исследований *in vivo* на стадии доклинических испытаний».

Основной задачей проведения доклинических испытаний (ДКИ) является определение целесообразности проведения дальнейших испытаний. Именно на этом этапе оценивается наличие как положительных, так и отрицательных эффектов: определение биодоступности разных форм препарата, подбор пути введения в организм, определение стартовой дозы, а также оценки токсичного действия на органы, регистрация аллергических реакций на введение препарата в организм.



Ирхин Сергей, ООО «Диаэм»

Наиболее популярным модельным организмом для проведения начальных этапов доклинических исследований являются мыши: они относительно просты в содержании, быстро плодятся, требуется небольшой объем дозы.

Основная проблема при постановке экспериментов *iv vivo* в том, что для проведения полноценного эксперимента потребуется большое количество мышей. Основная задача исследователя – отследить все этапы процесса. Но поскольку все процессы проходят в теле подопытного организма и, как правило, скрыты от глаз исследователя, возникает необходимость умерщвлять подопытных через равные промежутки времени, готовить десятки препаратов из внутренних органов, в надежде увидеть искомое. В итоге тратятся колоссальные ресурсы и время сотрудников, не говоря о десятках и сотнях мышей умерщвленных «в пустую».

Все вышесказанное обусловливает необходимость применения не инвазивных методов визуализации процессов *in vivo*.

На текущий момент есть несколько вариантов прижизненного имиджинга на мелких лабораторных животных: это системы, использующие ионизирующее излучение (рентген и системы микротомографии) и системы детекции и регистрации биолюминисцентных и флуоресцентных меток.

Микротомографы и рентгенгеновские аппараты дороги сами по себе, не просты в обслуживании, и не позволяют проводить длительные эксперименты.

Из систем детекции люминисценции и флуоресцентного сигнала особого внимания заслуживает система Newton 7.0. от компании Vilber.

Система биоимиджинга Newton 7.0 разработана для проведения неинвазивных исследований *in vivo* на мелких лабораторных животных (мыши и крысы). Она позволяет проводить длительные эксперименты под наркозом, делать количественную оценку интенсивности сигнала и 3D реконструкцию для более точной локализации сигнала.

Современное ПО позволяет регистрировать изменение интенсивности и локализации сигнала, с возможностью сшивки изображений, полученных в разное время от одного объекта. Эта функция позволяет исследователю визуально и количественно оценить те эффекты, которые возникают в подопытном организме как реакция на введение препарата: оценить динамику распределения препарата в организме в течении времени и сделать вывод об эффектив-

ности такого способа введения, а также оценить эффективность препарата в отношении паталогических процессов в режиме реального времени.

Функция количественного анализа позволяет оценить изменение интенсивности сигнала от подопытного и получить данные о динамике процесса без необходимости умерщвления мыши даже на самых ранних стадиях эксперимента. Функция 3D реконструкции позволяет локализовать органы из которых идет сигнал, что дает исследователю возможность прицельно работать с нужными органами.

Система Newton 7.0 может комбинироваться с системами газовой анестезии, что позволяет эффективно обездвиживать подопытных и гуманно проводить длительные исследования с минимальным вредом для подопытных.

В рамках второй секции **Артем Доротенко**, специалист компании **Герофарм**, представил слушателям доклад на тему «Особенности биостатистических методов в доклинических исследованиях сопоставимости».



Артем Доротенко, Герофарм

Спикер поделился со слушателями особенностями проведения неклинических исследований биоаналогичных препаратов и тем, почему эти особенности имеют место быть. На примере воспроизведенных препаратов мы рассмотрели следующие неклинические этапы изучения *in vitro*/*in vivo*:

- связывание с мишенью (изучение кинетики ЛРВ *in vitro*; BLI, SPR, замещение радиоактивной метки и пр.)
- биологическая активность (функциональные тесты на клеточных линиях *in vitro*; фотометрические, люминесцентные и пр. методы детекции)
- ФК/ФД *in vivo* (Изучение специфических эффектов на моделях *in vivo*; ФК – аналитические методики; ФД – инструментальные и лабораторные тесты).

Арон Берковский, **НПО Ренам**, рассказал о методах определения активности гепаринов.



Арон Берковский, НПО Ренам

Мы обсудили вопросы функционирования системы гемостаза, взаимовлияния про- и анти-коагулянтных систем организма. Также в докладе были рассмотрены механизмы влияния гепаринов на свертывающую систему крови и ингибирования сериновых протеаз коагуляционного каскада. Особое внимание было уделено технике выполнения анализов активности гепарина как коагулологическими, так и хромогенными методами, а также показана возможность использования коагулологических методов для доказательства биоэквивалентности исследуемых препаратов гепарина *in vitro*.

В своем докладе **Тимофей Комаров, ООО «ЦФА»**, рассмотрел особенности проведения преаналитического этапа клинических исследований лекарственных препаратов: взаимодействие клиники и лаборатории.

В докладе были представлены примеры из реальной практики, иллюстрирующие ошибки, приводящие к искажению результатов исследований биоэквивалентности, такие как ошибки на стадии планирования эксперимента: некорректный выбор биологической матрицы, выбор аналитического оборудования, недостоверные и противоречащие друг другу данные научных публикаций по теме исследования. Также были рассмотрены ошибки со стороны клинического центра: неправильное дозирование, нарушение процедуры отбора биообразцов и их хранения.



Тимофей Комаров, ООО «ЦФА»

Мария Колганова, ООО «ЦФА», представила доклад на тему «Изучение фармакокинетики и иммуногенности биологических ЛП: комплексный подход к анализу на примере инновационного препарата-ингибитора ИЛ-1».



Мария Колганова, ООО «ЦФА»

Основное внимание в докладе было уделено организации процесса проведения исследований фармакокинетики и иммуногенности биологических лекарственных препаратов в биоаналитической лаборатории, в рамках выполнения аналитической части клинических исследований как оригинальных, так и биоаналоговых лекарственных препаратов.

Были рассмотрены основные проблемы, с которыми может столкнуться лаборатория при выполнении исследования, а также цели, задачи и внутрилабораторные процессы, сопровождающие проведение таких исследований. Были освещены основные нормативные документы Евразийского экономического союза, регулирующие проведение исследований фармакокинетики и иммуногенности биологических препаратов в биоаналитической лаборатории. Также на конкретном примере RPH-104, препарата компании Р-фарм, связывающего ИЛ-1β и снижающего выраженность воспалительных процессов при таких заболеваниях как рецидивирующий перикардит, семейная средиземноморская лихорадка и болезнь Стилла взрослых, были рассмотрены разработанные и валидированные на базе ООО «ЦФА» методики количественного определения RPH-104 и полуколичественного определения иммуногенности (противолекарственных антител к RPH-104) в сыворотке крови субъектов КИ. В рамках аналитической части исследования в фармакокинетическом анализе было проанализировано 370 биообразцов, а в анализе иммуногенности был проанализирован 201 образец от 22 пациентов с рецидивирующим перикардитом. По результатам анализа иммуногенности у 3 пациентов из 22 (6 биообразцов) были выявлены антитела к RPH-104, при этом только в 1 образце выявленные антитела обладали нейтрализующей активностью по отношению к RPH-104.

Таким образом, на конкретном примере проведения аналитической части клинического исследования было продемонстрировано, что именно комплексный подход к проведению работ в лаборатории способствует получению достоверных, воспроизводимых и своевременных результатов для исследуемых образцов, при этом важно помнить, что за любым образцом в лаборатории стоит реальный пациент/доброволец и, в случае биологических лекарственных препаратов, зачастую пациент с орфанным или онкологическим заболеванием.

Анна Карпенко, Р-Фарм, поделилась со слушателями особенностями проведения клинических исследований препаратов олокизумаба: исследования фармакокинетики и иммуногенности.



Анна Карпенко, Р-Фарм

Клиническая разработка олокизумаба началась в 2008 году с исследований 1 и 2 фазы и продолжилась в компании «Р-Фарм» международными мультицентровыми испытаниями 3 фазы после консультаций и одобрения зарубежными регуляторными органами. В 2020 г. препарат под торговым наименованием Артлегиа® был зарегистрирован для лечения ревматоидного артрита, а также включен в национальные ре-

комендации лечения COVID-19. Показание COVID-19 было внесено в инструкцию по медицинскому применению Артлегиа® в июне 2021 г.

Разработка методов анализа фармакокинетики и иммуногенности велась на всем протяжении клинической программы исследования олокизумаба. Стоит отметить, что модификация и адаптация методов должна выполняться в соответствии актуальным нормативным требованиями, новой информацией о препарате, терапевтическими показаниями. А поддержание валидных методов анализа, отвечающих задачам исследования на протяжении всей клинической программы, является обязанностью разработчика. Регуляторные органы уделяют особенное внимание валидации методов анализа фармакокинетики и иммуногенности терапевтических белков, как показателей безопасности и эффективности.

Закрывал конференцию генеральный директор **Центра Фармацевтической Аналитики**, **Шохин Игорь Евгеньевич**. Он подытожил важность проведения исследований биотехнологических препаратов в соответствии с действующим законодательством, поблагодарил слушателей за проявленный интерес к мероприятию, а также выразил надежду на дальнейшее плодотворное сотрудничество.


НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

Программа конференции
"Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств"
17 июня 2022 г.

10:50 – 11:00	**Открытие конференции**
10:50 – 11:00	**Наталья Кульджанова** (директор журнала **"Разработка и регистрация лекарственных средств"**)
11:00 – 11:40	**Aleksandra Wyciszkiewicz** (PhD Field Application Specialist CEE & Russia **Sartorius BioAnalytics).** Использование технологической платформы безмаркерной интерферометрии биослоя Octet BLI для характеристики критически важных молекул в процессе разработки лекарств
11:40 – 12:00	**Гненденков Павел Леонидович** (специалист по технологиям ферментации и одноразовым технологиям **Сарториус Стедим РУС).** Контрактная разработка комплексных решений для производства белков на основе линий СНО
12:00 – 12:30	**Сергей Ирхин** (старший специалист-консультант отдела продвижения **Диаэм).** Применение технологии прижизненного 3D-имиджинга для изучения динамики распределения препаратов в организме лабораторных животных *in vivo* на стадии доклинических испытаний
12:30 – 13:00	**Кофе-брейк**
13:00 – 13:20	**Артём Доротенко (Герофарм).** Особенности биостатистических методов в доклинических исследованиях сопоставимости
13:20 – 13:40	**Александр Солодовников (Statandocs).** Изменение подходов к проведению доклинической и клинической разработки препаратов на основе низкомолекулярных гепаринов
13:40 – 14:00	**Арон Берковский (НПО Ренам).** Методы определения активности гепаринов
14:00 – 14:20	**Тимофей Комаров (ЦФА).** Особенности преаналитического этапа клинических исследований лекарственных препаратов: взаимодействие клиники и лаборатории
14:20 – 15:00	**Обед**
15:00 – 15:15	**Мария Колганова (ЦФА).** Изучение фармакокинетики и иммуногенности биологических ЛП: комплексный подход к анализу на примере инновационного препарата-ингибитора ИЛ-1
15:15 – 15:30	**Дмитрий Рождественский (ЕЭК).** Актуализация правил исследования биологических лекарственных средств в праве Союза
15:30 – 15:45	**Татьяна Смолянова (Нацимбио).** Разработка стандартного образца для определения специфической активности препарата «КОВИД Глобулин»
15:45 – 16:00	**Анна Карпенко (Р-Фарм).** Клинические исследования препаратов олокизумаба: исследования фармакокинетики и иммуногенности
16:00 – 16:15	**Игорь Шохин (ЦФА).** Комментарии к Решению 89 ЕЭК по аналитической части клинических исследований биологических лекарственных средств: опыт исследований ООО «ЦФА»
16:15	**Дискуссия, подведение итогов**

Партнеры: SARTORIUS, ДИАЭМ, BIOTechno Group, ERWEKA

МОСКОВСКИЙ ЦЕНТР ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

Информационные партнеры: Sciencefiles, ЛАБОРАТОРИЯ И ПРОИЗВОДСТВО

Мы в Телеграм

Журнал "Разработка и регистрация лекарственных средств"



Шохин Игорь Евгеньевич,
ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»

Организаторами конференции выступают – ООО «Центр фармацевтической аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Партнеры мероприятия: компании Сарториус, Диаэм, БИОТЕХНО, Эрвека, Московский Центр Инновационных Технологий в Здравоохранении

Информационные партнеры мероприятия: журнал «Лаборатория и Производство», компания «Sciencefiles».

Приглашаем Вас присоединиться к конгрессу «Разработка и регистрация лекарственных средств», который пройдет в Москве 1–2 декабря 2022 г. Подробности и регистрация на сайте конгресса.

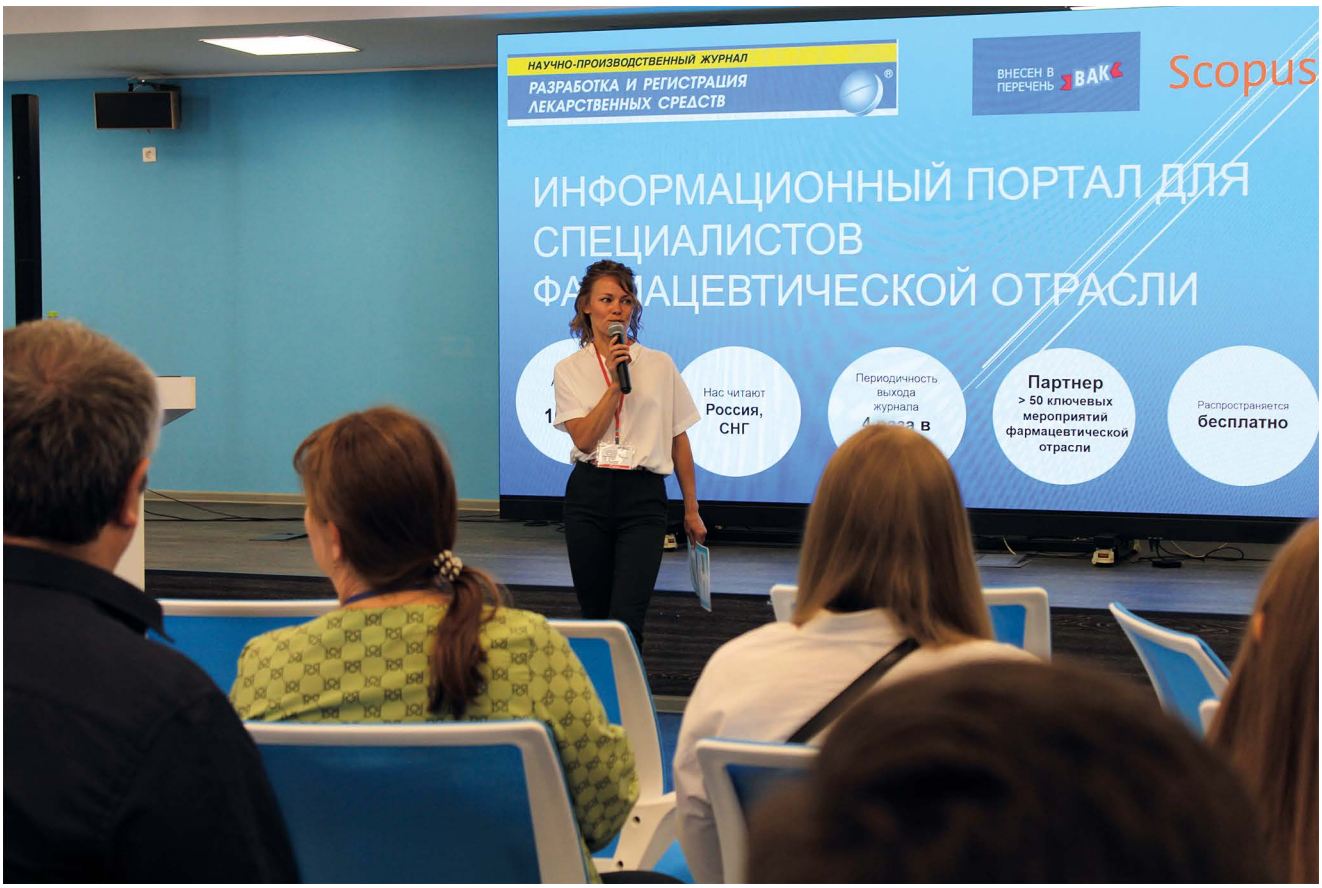











НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК
Scopus
ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОРТАЛ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ
Нас читают Россия, СНГ
Периодичность выхода журнала
Партнер
> 50 ключевых мероприятий фармацевтической отрасли
Распространяется бесплатно








statExpert
Изменение подходов к проведению доклинической и клинической разработки препаратов на основе низкомолекулярных гепаринов













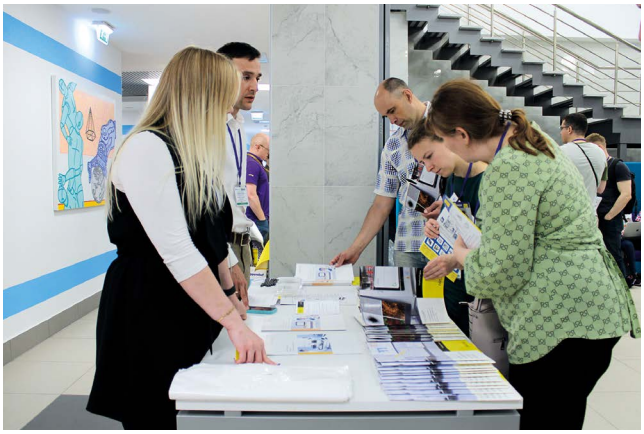

Разработка метода определения
нейтрализующих антител к SARS-CoV-2
Результаты корреляционного анализа 1499 индивидуальных образцов

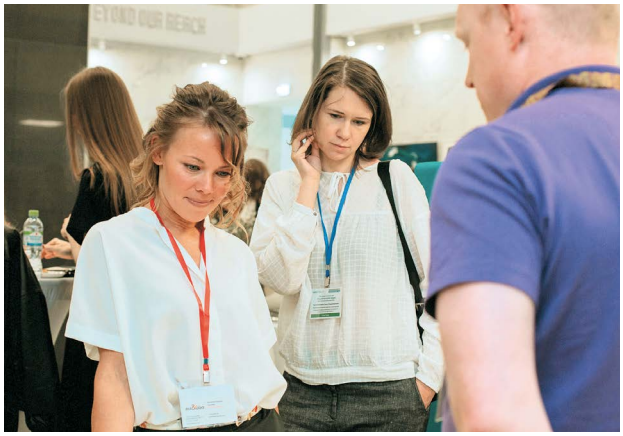

Group
Techno
















447



УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

Возрождение химической промышленности России в советский период (1917–1927 гг.). Часть 3

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

В третьей части представлены воспоминания В. Н. Ипатьева о его поездках по Германии, Франции, Англии, Бельгии и другим странам Европы с целью встречи с бывшими хозяевами заводов для организации получения ими концессий и закупки лицензий на использование в новых схем и способов получения химических продуктов на восстановленных предприятиях. Кроме того, В. Н. Ипатьева описывает свое участие в работе над налаживанием синтеза удушливых газов, отечественного противогаза и организации работы общественной организации «Доброхим».

Revival of the Russian chemical industry during the Soviet period (1917–1927). Part 3

Konstantin S. Guzev✉

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

✉ **Corresponding author:** Darya A. Fadeeva. **E-mail:** guzev3@yandex.ru

Abstract

The third part presents the memoirs of V. N. Ipatiev about his trips to Germany, France, England, Belgium and other European countries in order to meet with the former owners of the plants to organize their obtaining concessions and purchase licenses, for the use in new schemes and methods for obtaining chemical products at refurbished facilities. In addition, VN Ipatieva describes her participation in the work on establishing the synthesis of asphyxiating gases, the domestic gas mask and organizing the work of the Dobrokhim public organization.

Первая поездка В. Н. Ипатьева за границу состоялась в декабре 1921 г. Для этого ему был вручен особый дипломатический паспорт члена правительства России. Сложность поездки заключалась в том, что Ипатьев представлял побежденную страну, был членом непризнанного (кроме Англии и Германии) правительства, к которому большинство стран относилось с презрением. Целью командировки в основном была Германия, а конкретно – химические компании, имеющие на территории России в довоенный период свои заводы. Однако после посещения российского Торгпредства ему было поручено вести переговоры не только с немецкими фирмами, а с любыми, выразившими желание получить концессии в СССР, в результате чего В. Н. Ипатьеву пришлось сделать солидный круг по Европе.

Благодаря длительной и эффективной работе по организации химической промышленности в России до Первой мировой войны и во время военных действий В. Н. Ипатьев был лично знаком со многими руководителями как отечественных, так и зарубежных компаний, их главными технологами, инженерами, ведущими специалистами, начальниками цехов. Благодаря научной, педагогической и практической деятельности Владимир Николаевич, посещая зарубежные предприятия, расположенные по всей Европе, встречал своих старых знакомых, коллег и учеников, эмигрировавших в Европу. Это факт в значительной степени облегчал ведение переговоров с зарубежными специалистами.

Первая компания, с которой Ипатьеву пришлось вести переговоры, стала Bayerish Stickstoff Werke. Эта фирма производила, главным образом, кальций-цианамид, имеющий довольно большой спрос в Германии и за ее пределами в качестве хорошего азотного удобрения. Эту компанию в то время возглавляли профессор Никодем Каро, знакомый с Ипатьевым по работам до войны, и Михаел Франк – сын бывшего владельца компании профессора Франка. Целью встречи было знакомство с процессом производства кальций-цианамида с перспективой внедрения его на отечественном предприятии. Им мог стать завод по каталитическому окислению аммиака воздухом в г. Юзовке (Донбасс), который начинали строить еще во время войны. Эта первая зарубежная встреча с владельцами германского концерна прошла неожиданно гладко. Профессор Каро сразу стал говорить с В. Н. Ипатьевым на русском языке, что позволило

быстро наладить взаимопонимание между сторонами. Каро сказал, что хорошо знаком с научными работами В. Н. Ипатьева и напомнил ему об их знакомстве на 7-м Лондонском международном конгрессе по чистой и прикладной химии в 1909 г. Ипатьев, в свою очередь, проинформировал коллегу о целях поездки, а также о желании посетить производства и научные лаборатории компании. В заключение Каро заявил, что он совместно со своим компаньоном был бы очень рад возобновить работу в России, так как считал, что Германия и Россия должны дружить ввиду многих общих интересов.

В эту командировку В. Н. Ипатьев встретился также с Ф. Габером – профессором Института кайзера Вильгельма. При этом Габер практически настоял на их встрече, лично вышел встречать Ипатьева, поджидая его возле станции метро, привел домой и познакомил со своими домашними. В результате между ними состоялась теплая и доверительная беседа, в основном на научные темы. Однако касались они и вопросов экономического состояния России и Германии. Профессор Габер пригласил Владимира Николаевича посетить его университетскую лабораторию и дал несколько рекомендательных писем к известным промышленникам Англии и Франции, куда В. Н. Ипатьев собирался поехать сразу после Германии. При следующей встрече профессор Каро поднял вопрос о возможности для В. Н. Ипатьева прочитать несколько лекций по теме высокотемпературного катализа в университетах Берлина. Получив согласие Ипатьева, он созвонился с ведущими профессорами и ректорами химических факультетов Берлина. В результате лекции были прочитаны (правда, чуть позднее по приезде из Франции и Бельгии), лаборатории осмотрены, переговоры для уточнения возможностей сотрудничества сторон проведены. Мы умышленно подробно описали работу В. Н. Ипатьева во время первой берлинской командировки. Так было всякий раз, когда он приезжал в какую-либо европейскую страну. Он удачно сочетал личные связи со связями научными, благодаря чему коммерческие проблемы решались для Советской России положительно и оперативно.

Создается впечатление, что у В. Н. Ипатьева везде, даже в государственных структурах некоторых европейских стран, были свои знакомые. Так, визы на въезд во Францию и Бельгию ему удалось получить только после обращения к друзьям, с которыми он взаимодействовал во время войны. Его коллеги помогали организации деловых переговоров между заинтересованными лицами и компаниями. Многие из них работали под его руководством в Химическом комитете при Главном Артиллерийском Управлении Военного министерства или в других министерствах, осуществлявших взаимодействие по делам обороны. У Ипатьева были особенные отношения и с учеными-химиками и металлургами ведущих европейских стран. Как только становилось известно о его приезде или даже перспективе приехать к ним в страну, они писали В. Н. Ипатьеву или посещали его лично, приглашая посетить их кафедры и университетские лаборатории.

В. Н. Ипатьев ездил в зарубежные командировки не один. ВСНХ также посылал за границу своих специалистов из других отраслей промышленности для налаживания добрососедских отношений и производственных связей. Об этом В. Н. Ипатьев неоднократно упоминает в своей монографии.

После Германии была Англия. Эта страна одной их первых признала советское правительство, сделав это из чисто коммерческих соображений. В этом плане характерна фраза Ллойд Джоржа: «*Торговать можно и с людоедами*». Л. Б. Красин создал в Лондоне организацию «Аркос» (англо-русское общество), предназначенную для проведения торговых сделок между Великобританией и Россией. В ее штате насчитывалась не одна сотня сотрудников, деятельность которых приносила пользу молодой России, но не всегда, в связи с чем работа этой организации не могла быть оценена однозначно.

В Англии В. Н. Ипатьеву также пришлось воспользоваться своими личными связями, что позволило ему провести несколько встреч для решения важных вопросов по взаимодействию с заинтересованными компаниями Англии. Благодаря этим связям удалось встретиться с известным в деловых кругах промышленником Л. Урквартом, который вел переговоры с Л. Б. Красиным о взятии в концессию своих бывших заводов на Урале. И если в начале переговоров стороны не могли по разным причинам договориться о взаимовыгодном сотрудничестве, то после встречи англичанина с В. Н. Ипатьевым были выработаны приемлемые условия для отдачи Кыштымских медных заводов на условиях концессии английской компании. Однако, несмотря на явную выгоду этого контракта для СССР, он был отклонен Совнаркомом, и концессия не состоялась. Этот факт никак не повлиял на личные взаимоотношения В. Н. Ипатьева и Уркварта. В дальнейшем они встречались в домашней обстановке, спокойно обсуждали политическое и финансовое положение России. Об этих встречах и переговорах с ним В. Н. Ипатьев информировал В. И. Ленина в одном из отчетов.

Во время посещения Шотландских предприятий по переработке сланцев Ипатьев и сопровождавшие его специалисты ознакомились с новым способом получения парафина и газолина, который целиком шел для автомобилей.

В конце января 1922 г. В. Н. Ипатьев и Л. Ф. Фокин отправились в Бельгию для переговоров с бельгийскими промышленниками, имеющими металлургические и химические заводы в дореволюционной России. Несмотря на то, что посещение Бельгии не должно было продолжаться более двух недель, планировалось провести большое количество переговоров. Так, им удалось встретиться с Г. Гомоном – бывшим директором Константиновских стекольных и химических заводов, с Ефроном – директором правления Южно-Днепровских заводов в Кадиевке, с директором Бельгийских металлургических заводов в Енакиево, директором правления коксовых печей

Коппе, директором правления Содовых заводов Сольвей, с правлением банка Sosiété Genervise, который кредитовал бельгийские предприятия в России. В Льеже они имели долгую беседу с директором правления бывших Таганрогских металлургических заводов, посетили коксовые печи завода Coquerille. Из всех этих встреч и разговоров представители России вынесли впечатление о сильном желании собеседников возобновить работу на своих заводах даже при непростых условиях, создавшихся в России. И в Бельгии тоже было много встреч с коллегами по Химическому комитету, Артиллерийской академии и Военному ведомству.

Французская часть командировки была также очень насыщенной. Первым делом В. Н. Ипатьев встретился в Париже со своим другом проф. И. Е Фроссаром, который имел неограниченные права по ревизии химической промышленности Германии, полученные им после подписания Версальского договора. Особый интерес французов вызывала компания Interessen Gemeinschaft, выпускающая краски для красильной промышленности. Благодаря сложной политической обстановке французские специалисты без труда узнавали все секреты производства красок, получая производственные регламенты и чертежи аппаратуры. Это дало им возможность в краткие сроки установить подобное производство у себя в стране. В. Н. Ипатьев в сопровождении Фроссара посетил вновь построенный завод по производству красок. На этом заводе он встретил своих знакомых химиков-французов, работавших на заводах Н. Н. Коншина в Серпухове и Н. А. Второва в Москве, а также двух русских химиков, сотрудничавших с ним во время войны. Зная, что многие французские предприниматели желали встретиться с Ипатьевым, Фроссар устроил деловой завтрак, на который собралось около 30 промышленников. В течение трех часов велась оживленная беседа о прошлом, настоящем и будущем взаимодействия между Россией и Францией. Кроме того, академик T. Haller, который был хорошо знаком с Ипатьевым и его научными работами, устроил также банкет, в котором приняли участие выдающиеся химики Франции. Владимир Николаевич вспоминает: «*Участники банкета очень тепло отнеслись к нему, и довольно теплая беседа затянулась допоздна*».

Будучи в Париже, В. Н. Ипатьев по протекции Фроссара получил разрешение посетить немецкие заводы компании Interessen Gemeinschaft (IG) в Леверкузене, Баденские анилиновые и содовые заводы в Людвигсгафене (краски и фармацевтические препараты – аспирин, сальварсан и др.) и компанию «Фарбверке» около Франкфурта. Немцы из IG устроили ему радушный прием и показали все мастерские, производства, музей и научные лаборатории, представляющие собой настоящие «дворцы науки». Продемонстрировали также новые дома для рабочих, клуб и больницу. После осмотра, на «рабочем завтраке», и хозяева, и гости пришли к заключению, что Германии выгодно иметь Россию сильной для того, чтобы гарантировать политическое и экономическое равновесие в Европе.

На Баденской анилиновой фабрике В. Н. Ипатьев с особым интересом осмотрел цех по получению аммиака из азота и водорода под большим давлением и при высокой температуре. При посещении немецких предприятий от инженеров, с которыми Ипатьеву приходилось встречаться, он часто слышал, что основные химические процессы проходят по «методу Ипатьева». Они благодарили его за эту разработку и называли его «самым дешевым работником», так как он никогда патенты на свои открытия не оформлял. Зарубежные исследователи повторяли его эксперименты и патентовали эти процессы, ограждая себя и свои производства от конкурентов. В этом ощущалась еще одна слабость российской науки. Наши ученые мало уделяли внимания патентованию своих открытий, и это надо было срочно исправлять.

Во время этой командировки Ипатьеву приходилось решать много различных задач, не всегда связанных с химической промышленностью. Интерес представляет история посещения г-на Онегина, проживающего в Париже, для переговоров о передаче советскому правительству собранных им в течение жизни предметов и корреспонденции, относящихся к жизни и деятельности А. С. Пушкина. По словам Ипатьева, Онегин представлял собой живого старичка 70 лет, который говорил о себе: «*Я русский человек до корня волос, и моим заветным желанием является мечта, чтобы моя коллекция после смерти влилась бы в Пушкинский музей Российской Академии наук*». Поэтому он обратился к правительству с предложением завещать свою коллекцию музею СССР, но с тем условием, что до конца жизни он бы получал небольшую сумму для скромного проживания и оплаты музейного помещения. Он добавил: «*Я не приятель большевиков, но я сделал это предложение только потому, что все это должно принадлежать моей стране, России*». В итоге в отчете Красину по этому вопросу были даны благоприятные заключения относительно приобретения коллекции Онегина. Кроме того, г-н Онегин предупредил Ипатьева об опасности, подстерегающей его в Париже. Эмигрантские круги были очень недовольны приездом «предателя-генерала» и могли организовать провокации.

Кроме разговоров с французскими предпринимателями, учеными-химиками и банкирами, заинтересованными в русских делах, В. Н. Ипатьев посетил завод Paulencs Freres по производству химических реактивов, которых катастрофически не хватало в Росии.

Во время пребывания в Лондоне В. Н. Ипатьева посетили бывшие директора Невских стеариновых заводов в Москве и Петербурге и Пивоваренного завода в Петербурге. Главным акционером этих компаний был очень богатый англичанин мистер Казалет. Узнав о приезде Ипатьева, он очень просил его заехать и рассказать о ситуации на его предприятиях. Во время их встречи В. Н. Ипатьев проинформировал Казалета, что пивоваренный завод «стоит», а свечные и мыловаренные производства работают, правда, не с той нагрузкой, как прежде. Интерес представляет их диалог. Владелец заводов пояснил, что его вложения в российские заводы составляют около 15 мил-

лионов рублей. Учитывая общую сумму его капиталов, потеря этих производств его не разорит, но как человек, построивший эти предприятия с нуля, он не может смириться с их полной потерей. Ипатьев пояснил ему, что основываясь на декрете о концессии, он может взять эти предприятия в аренду и, обеспечив их новым оборудованием и сырьем, будет иметь право на часть готовой продукции, которую сможет реализовывать по всему миру, покрывая, таким образом, свои затраты на новые вложения.

Во время пребывания в Берлине В. Н. Ипатьев познакомился с председателем спичечного треста Д. С. Гальпериным, который вел переговоры в Швеции по вопросу концессии шведской спичечной компании, во главе которой до революции стоял известный капиталист Крюгер.

После возвращения из Франции и Бельгии в Германию д-р Каро попросил Ипатьева о свидании для обсуждения вопроса концессии по некоторым химическим процессам. В этом случае речь шла о налаживании на имеющихся в России заводах новых технологических процессов получения кальций-цианамида из карбамида кальция и азота воздуха, а также получения аммиака из водорода и азота воздуха. Эти продукты в мирное время могли бы быть использованы при получении удобрений, а в военное – в производстве взрывчатых веществ. Для решения этого вопроса была организована поездка на расположенный в предместьях Берлина завод, специализирующийся на производстве карбида кальция, цианамида, аммиака и аммиачной селитры.

За время своей длительной командировки в страны Европы В. Н. Ипатьев заложил прочный фундамент взаимоотношений с руководителями ведущих химических концернов и учеными-химиками, владеющими патентами на современные производственные процессы. Вернувшись в Москву, Ипатьев подробно в отчетах В. И. Ленину описал все дела, проделанные за время поездки.

Надо сказать, что кроме Ипатьева за границу были командированы и другие российские эксперты. Так, весной 1922 г. по нефтяным делам (продажа нефти и закупка оборудования) в Берлин были отправлены член Президиума ВСНХ И. Т. Смилга и профессор Л. К. Рамзин (консультант главного управления по топливу).

Ввиду того, что Россия никогда не производила химических реактивов и для работы своих лабораторий всегда закупала их за границей, Комиссариат народного просвещения командировал в Германию (Берлин) особую комиссию по закупке реактивов для всех высших учебных заведений под руководством В. Н. Крестинского. Фирма Kahlbaum, которая должны была получить большой заказ на реактивы, пригласила некоторых членов комиссии посетить их завод в Берлине. Во время осмотра гости смогли ознакомиться с технологией получения некоторых сложных реактивов, и после необходимого согласования с центром контракт на производство реактивов для России был заключен.

Необходимо указать еще на один факт, который оказал ощутимое влияние на сближение России и Германии. 6 мая 1921 г. в Берлине было подписано Временное соглашение между Российской Социалистической Советской Республикой и Германией [Приложение XIV]. В статьях XII–XV этого соглашения описаны условия возможного экономического взаимодействия, а в статье XVI прямо указано: «До заключения будущего торгового договора настоящее соглашение должно служить основой хозяйственных отношений обеих сторон и толковаться в духе взаимного благожелательства, направленного к укреплению экономических отношений». Практически через год (16 апреля 1922 г.) во время Генуэзской конференции между СССР и Германией был заключен особый договор, названный по месту его подписания Рапалльским. По этому договору Россия и Германия взаимно отказались от возмещения военных расходов, военных и невоенных убытков, расходов на военнопленных, ввели принцип наибольшего благоприятствования при осуществлении взаимных торговых и хозяйственных отношений; помимо этого Германия признала национализацию немецкой частной и государственной собственности в РСФСР и аннулирование царских долгов Советским правительством. Для России Рапалльский договор означал расторжение международной дипломатической изоляции, а для Германии это был первый равноправный договор после унижений Версаля. Благодаря этому договору Россия получила возможность использовать технические достижения немецкой военной, в том числе и химической, промышленности, а Рейхсвер мог готовить кадровых военных, специалистов по химическому оружию и тайно обучать своих офицеров обращению с новым оружием, изготовление и владение которым было запрещено в Германии. Таким образом, Германия и Россия делались союзниками и должны были помогать друг другу при нападении на них других держав. В результате эти две страны еще плотнее стали сотрудничать во взаимовыгодном сближении их химических промышленностей. Доказательством этого тезиса может служить количество поступивших предложений на заключение концессионных договоров от различных стран за 1925/1926–1927/1928 гг. (таблица 1).

Как видно из данных, представленных в таблице, германские промышленники занимали значительную долю всех концессионных предложений, сделанных России в течение 1925–1928 гг.

26 мая 1922 г. в Петрограде открылся Менделеевский химический съезд. В. Н. Ипатьев на нем присутствовал. Более того, он выступил на объединенном заседании по физике и химии с кратким отчетом об итогах командировки в Европу. Это сообщение было принято с большим воодушевлением. В работе съезда приняло участие большое число как петроградских, так и иногородних химиков, причем для проживания последних было организовано бесплатное общежитие. Все расходы на проведение съезда покрыл ВСНХ.

Таблица 1. Распределение поступивших концессионных предложений в Главконцесском в течение 1925/1926–1927/1928 гг. хозяйственных годов по ведущим странам

Table 1. Distribution of received concession proposals in Glavkontsesssky during 1925/1926–1927/1928 business years by leading countries

Страна Country	1925/1926	(%)	1926/1927	(%)	1927/1928	(%)
Германия Germany	199	41,3	102	38,8	63	31,5
США USA	41	8,5	16	6,1	34	17,0
Франция France	33	6,8	16	6,1	20	10,0
Англия England	30	6,2	26	9,9	7	3,5
Польша Poland	42	8,7	7	2,7	9	4,5
Австрия Austria	24	5,0	14	5,3	4	2,0
Латвия Latvia	12	2,5	9	3,4	4	2,0
Швеция Sweden	9	1,9	9	3,4	2	1,0
Швейцария Switzerland	–	–	–	–	7	3,5
Чехословакия Czechoslovakia	16	3,3	4	1,5	2	1,0
Прочие Other	76	15,8	60	22,8	48	24,0
Всего Total	482	100,0	263	100,0	200	100,0

К лету 1922 г. В. Н. Ипатьев оставался членом Президиума ВСНХ и председателем коллегии Научно-технического отдела (НТО). При НТО числилось некоторое количество лабораторий, располагающихся на базе Высших учебных заведений (ВУЗов). На тот момент при НТО ВСНХ состояли следующие научно-технические институты:

1. Химический институт им. Карпова (г. Москва).
2. Институт прикладной химии с опытным заводом (г. Петроград).
3. Государственный Научно-технический институт (ГОНТИ, г. Петроград).
4. Институт прикладной минералогии (г. Москва).
5. Институт удобрений (г. Москва).
6. Электротехнический институт (г. Москва).
7. Институт прикладной физики (г. Москва).
8. Техно-физический институт (г. Петроград).
9. Аэродинамический институт (г. Москва).
10. Главная палата мер и весов (г. Петроград).
11. Гидравлическая лаборатория при Тимирязевской сельскохозяйственной академии (г. Москва).
12. Институт силикатов (г. Москва).
13. Институт прикладной механики (г. Петроград).

Чуть позже были организованы Лесной институт, Институт двигателей в Петрограде и Механический институт в Москве.

Кроме этих институтов НТО субсидировал некоторых ученых, которые проводили исследования в частных лабораториях. Конечно, большинство этих заведений располагались в старых зданиях, как правило, состоящих из квартир, не приспособленных для этой цели, и требовали полной реконструкции. В. Н. Ипатьеву с сотрудниками НТО удалось выхлопотать необходимые средства на постройку новых великолепных зданий для большинства институтов, построенных по специальным проектам. В 1922 г. при НТО был организован выпуск издания «Техническая энциклопедия» (редактор Л. К. Мартенс).

В то же время в НТО был поднят вопрос о необходимости отправки за границу нескольких профессоров химии для ознакомления с новейшими достижениями в этой области. Благодаря усилиям В. Н. Ипатьева был утвержден план командировок и выделены на них деньги. Из химиков было разрешено поехать за границу Н. Д. Зеленскому, А. Е. Чичибабину и Е. И. Шпитальскому.

В 1922 г. при Главном Артиллерийском Управлении был организован Химический комитет, в котором под руководством В. Н. Ипатьева была восстановлена работа по налаживанию производства отравляющих газов. Ипатьев неоднократно отмечал: «*Принимая во внимание наши дружественные отношения с Германией, можно надеяться, что мы могли бы получить от немцев техническую помощь, так как после войны ее химическая промышленность обогатилась новыми процессами, весьма важными для мирного времени, установление которых и в нашей стране крайне желательно*».

К декабрю 1922 г. строительство и оснащение Химического института при ВСНХ были закончены. Реконструкция старого особняка длилась более года, но благодаря проведенным работам в здании была создана отличная химическая научно-исследовательская лаборатория, отвечающая всем требованиям современной науки. Оборудованием этой лаборатории занимался Б. И. Збарский. Он был командирован в Германию, где закупил основное оборудование на отпущенную в большом количестве валюту. 16-го декабря состоялось официальное открытие института, где выступил председатель президиума ВСНХ А. И. Рыков, сказавший, что несмотря на тяжелейшее положение молодой республики, советское правительство отдает себе отчет в необходимости развивать науку, а потому и в будущем будет развивать строительство подобных научных учреждений.

В январе 1923 г. В. Н. Ипатьев был направлен во вторую заграничную командировку, но уже с научной целью. Во время следования в Германию (через Ригу в Кёнигсберг и до Берлина) в поезде он встретил начальника электрического треста Гольцмана, ехавшего в Германию на переговоры по вопросу закупки электрических принадлежностей, и работающего в коллегии НТО инженера И. И. Воронкова, цель поездки которого была научная командировка.

Предполагалось, что за время командировки В. Н. Ипатьев прочитает ряд лекций по химии высоких давлений и закупит некоторые приборы, приобретение которых из России не представлялось возможным. Для этого ему была отпущена валюта в количестве 1100 руб., которой он мог распоряжаться по своему усмотрению. Кроме того, было запланировано выступление с докладом для Немецкого химического общества. Отдельную часть командировки составляло посещение химических заводов. В. Н. Ипатьев самостоятельно и в компании с другими российскими специалистами смог посетить химические заводы, выпускающие буру, формалин, иприт, сероуглерод, бензоловый спирт, бензойный альдегид, бензойную кислоту. За время второй командировки Ипатьев принял живейшее участие в обсуждении вопроса о закупке и налаживании в СССР производства различных красок и пигментов. Интересно отметить, что по окончании Первой мировой войны французы забрали у немцев все описания производства этих соединений и стали производить их самостоятельно. Американцы пошли иным путем – они переманили к себе на службу на большие оклады два десятка наиболее знающих специалистов с немецких красильных заводов и стали налаживать производство красок у себя в Америке. России ни один из этих способов не подходил. Москва решила идти иным путем. Было созвано секретное совещание, на которое кроме российских представителей были приглашены руководители «И. Г. Фарбениндустри». В это время швейцарские и французские компании готовы были поставлять в Россию свои краски, а у «И. Г. Фарбениндустри» в Москве был уже создан консигнационный склад. В. Н. Ипатьеву удалось договориться о следующем: Россия гарантирует, что будет покупать краски только у немецкой компании, а она, в свою очередь, окажет нам помощь в налаживании производства некоторых полупродуктов, из которых мы в дальнейшем могли бы получать краски собственного производства. В результате длительных переговоров Россия получила техническую помощь в производстве четырех полупродуктов.

Будучи в Берлине, В. Н. Ипатьев совместно с немецкими коллегами предложил организовать научный журнал «Технические новости иностранной промышленности» и вошел в его редколлегию. Из этого журнала советские инженеры на протяжении шести лет (до 1928 г.) смогли узнавать наиболее важные технические новости зарубежной промышленности.

Во время командировки в Германию Ипатьев постоянно встречался с коллегами-химиками, посланными советским правительством для консультаций и решения конкретных технических задач. Так, Б. П. Сысоев был направлен в Германию для налаживания связей с фирмой Сольвей, а также с целью продажи российской соды, производимой трестом «Донсода».

В. Н. Ипатьев принимал активное участие в деятельности особого советского учреждения «Международная книга», которое должно было облегчить закупку за рубежом иностранных книг и журналов для высших учебных заведений России. Условия работы этой организации были таковыми: она централизованно закупала литературу за рубежом по заявкам институтов и отдельных ученых, а непосредственно покупку книг и журналов в России осуществляли за рубли в московском магазине, располагавшемся на Кузнецком мосту. По мнению Ипатьева, дела «Международной книги» шли очень хорошо, и она давала даже хорошую прибыль.

В период командировки в Берлин В. Н. Ипатьеву посчастливилось съездить в Норвегию. На заводы Владимира Николаевича категорически не пустили, а вот Норвежский минералогический институт он посетил и, по его словам, получил огромное удовольствие. Свои впечатления об этом институте он представил специальной комиссии по приезде в Москву. Впоследствии, когда ему пришлось защищать необходимость создания подобного института в России, он ссылался на пример маленькой Норвегии, которая не пожалела средств на создание великолепного института для исследования своих минеральных богатств. В результате к доводам Ипатьева прислушались, и подобный институт в России был организован.

Осенью 1923 г. В. Н. Ипатьев был привлечен к переговорам с германскими концернами по производству ядовитых газов (фосгена и иприта). Надо отметить, что по Версальскому договору Германия не имела права строить на своей территории предприятия, производящие взрывчатые и отравляющие вещества. Но никто не запрещал ей строить подобные предприятия на территории дружественной страны. Поэтому к 1923 г. между Россией и Германией начались серьезные переговоры о развитии военной промышленности в СССР. Для работы была создана смешанная комиссия, которая заседала в Москве и иногда в Берлине. Устраивались совещания, как пра-

вило секретные, на которых обсуждались вопросы строительства в России крупных заводов по производству иприта. Об итогах подобных совещаний информировались Военный отдел ВСНХ, Химический комитет при ГАУ и Революционный Военный Совет (председатель – М. В. Фрунзе). С немецкой стороны в комиссии принимали участие эксперты по военному снаряжению, офицеры Генерального штаба, представители финансового ведомства. Производство удушающих газов планировалось начать на заводе, расположенном на железнодорожной станции Иващенково в 40 верстах от Самары. Однако прежде чем подписывать какие-либо документы с немецкой стороной, была проведена ревизия ранее законсервированного завода в Самарской области, а в Германии освидетельствован завод Штольценберга – предпринимателя, предложившего свою схему получения этого газа. В результате длительных переговоров было достигнуто соглашение, регулирующее финансовые вклады сторон. Штольценберг получил от немецкого правительства подряд на строительство заводов фосгена и иприта в России. С нашей стороны была создана Комиссия для организации работы по строительству заводов, подчинявшаяся Реввоенсовету. По словам В. Н. Ипатьева, несмотря на бесконечную бюрократическую волокиту, постройка завода мало-помалу двигалась вперед. В августе 1924 г. совместная комиссия выехала для обследования проделанных работ на Самарский завод. В дальнейшем Ипатьев от работы в этой комиссии отошел, но завод под Самарой был достроен.

Получив необходимое количество удушающих газов, Химический комитет при ГАУ озаботился разработкой и производством современного противогаза. Во главе этой работы были поставлены профессор химии В. Хлопин и молодой инженер Н. Прокофьев, хорошо знакомые В. Н. Ипатьеву по работе во время Первой мировой войны. Благодаря этому знакомству Ипатьев был в курсе всех работ по данному проекту и эпизодически принимал участие в некоторых исследованиях. В частности, именно Ипатьев нашел такое вещество, которое не только поглощало известные на тот момент удушающие газы, но полностью задерживало табачный дым – сумму газообразных веществ, наиболее трудно поглощаемых имеющимися сорбентами. Еще один друг В. Н. Ипатьева – Е. И. Шпитальский – предложил выгодный способ получения этого вещества. Все это позволило в кратчайшие сроки подготовить научную базу и приступить к промышленному производству противогазов для действующей армии.

Одновременно с работой по развитию химической промышленности РСФСР в 1923 г. Ипатьеву приходилось заниматься делами образования. В частности, он был назначен членом отдела по техническому образованию ВСНХ и должен был наладить жизнь в высших учебных заведениях, куда поступали рабфаковцы. Он писал: «*При всем желании молодежи учиться в высших учебных заведениях, они не могли следить за курсами высшей математики, физики, химии, так как подготовка по элементарной математике и физике была совершенно недопустимой. Из школ, соответствующих прежним средним заведениям (гимназии и реальные училища), выходили совершенно необразованные люди. Оканчивающие школу не умели писать грамотно по-русски, не умели правильно выражать свои мысли ни словесно, ни письменно. Поэтому в высшей школе приходилось учить тому, что должно было быть сделано в средней школе*».

Для координации работы научно-исследовательских институтов в том же году В. Н. Ипатьев предложил коллегии НТО ВСНХ ежегодно собирать директоров этих заведений на конференцию для доклада о проделанных работах и принятия годовой программы дальнейших исследований. Для эффективной работы институтов и координации взаимодействия между ними и ВСНХ институты были разбиты на группы по специальностям: химическая, электротехническая, механическая, минералогическая и другие. Первая конференция состоялась в декабре 1923 г. В результате, по мнению Ипатьева, эта мера оказалась очень продуктивной, и подобные конференции стали собирать ежегодно.

В начале 1924 г. В. Н. Ипатьев делает очередную попытку обратить внимание правительства на крайне медленное развитие отечественной химической промышленности. Он подает в правительство обстоятельную докладную записку, в которой еще раз подчеркивает значение химии как в мирное, так и особо в военное время и предлагает организовать общественную организацию, призванную помочь развитию химической промышленности через усиление преподавания химии и расширение исследовательских работ в высших учебных заведениях. Это предложение довольно быстро нашло положительный отклик в президиуме ВСНХ. Организацию назвали «Доброхим», с членов разрешили даже собирать взносы; также был разработан особый значок для лиц, принимающих участие в ее работе. Смерть В. И. Ленина на время приостановила продвижение создания «Доброхима». Однако уже в мае 1924 г. в Большом театре состоялось заседание по учреждению этой общественной организации. Председателем «Доброхима» был избран Л. Д. Троцкий, заместителями председателя – В. Н. Ипатьев и М. В. Фрунзе. Как только у организации появились деньги (членские взносы, пожертвования трестов и частных лиц, а также сборы от чтения лекций и проведения концертов), из разных высших учебных заведений стали приходить делегации для получения денежной помощи химическим лабораториям, нуждающимся в приобретении реактивов, приборов, научной литературы. По возможности помощь оказывалась. Однако уже осенью 1924 г. работа начала сокращаться – активность руководства снижалась, посещения совещаний становились нерегулярными. «Доброхим» просуществовал около года и был слит с другой общественной организацией, заботившейся о развитии авиации – «Авиахимом», которая в дальнейшем была преобразована в «Осоавиахим» (1927 г.). Таким образом, что-либо серьезное для развития химической промышленности за такой короткий срок «Доброхим» фактически сделать не смог.

Рекламная статья / Sponsored article

Одновременный анализ смеси фармацевтических субстанций с помощью ВЭЖХ SCION LC 6000 с диодно-матричным детектором

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «АВРОРА»

Важной задачей фармацевтических и токсикологических лабораторий является задача быстрого и точного определения смесей активных фармацевтических ингредиентов в различных образцах, в том числе в образцах крови. В данной статье рассмотрен одновременный количественный анализ и идентификация двух распространённых фармацевтических ингредиентов (парацетамол и ибупрофен) на жидкостном хроматографе SCION LC 6000 с диодно-матричным детектором. В результате проведенного эксперимента было показано, что с помощью диодно-матричного детектора, имеющего возможность работы с несколькими длинами волн одновременно, можно определить оба вещества за один анализ. Также была показана превосходная линейность и повторяемость хроматографа SCION LC 6000, что доказывается низкими значениями RSD и высокими значениями R^2.

Simultaneous Analysis of Combination Active Pharmaceutical Ingredients by HLPC SCION LC 6000 with Diode Array Detector

The authors prepared the article with the financial support of LLC "AVRORA"

An important problem for pharmaceutical and toxicological laboratories is quick and accurate determination of mixtures of active pharmaceutical ingredients in various samples, including blood samples. This article shows the simultaneous quantitative analysis and identification of two common pharmaceutical ingredients (paracetamol and ibuprofen) on a SCION LC 6000 liquid chromatograph with a diode array detector. As a result of the experiment, it was shown that with the help of a diode-array detector with multi-wavelength function, it is possible to determine both substances in one injection. Excellent linearity and repeatability of the SCION HPLC-DAD was demonstrated with low RSD values and high R^2 values.

ВВЕДЕНИЕ

Как рецептурные, так и безрецептурные препараты содержат как минимум один активный фармацевтический ингредиент (АФИ) – биологически активное вещество с определенной терапевтической эффективностью. Часто для лечения симптомов используется комбинация нескольких АФИ. Необходимость в точных качественных и количественных методах анализа комбинированных фармацевтических препаратов постоянно растет.

При производстве фармацевтических препаратов содержание активных ингредиентов должно строго контролироваться. Также крайне важно вести наблюдения за пациентами, принимающими комбинированные препараты в течение длительного времени, для оценки риска передозировки и/или долгосрочных побочных эффектов, связанных с хроническим воздействием АФИ.

Компания SCION Instruments предлагает использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором (HPLC-DAD) для одновременного определения двух распространенных безрецептурных препаратов; Ибупрофен и Парацетамол, часто использующихся в комбинации как жаропонижающие, анальгетические и противовоспалительные средства. При использовании детектора с диодной матрицей можно идентифицировать несколько АФИ за один анализ за счет возможности установки длин волн для каждого анализируемого соединения, а также использования спектров поглощения для дальнейшего подтверждения фармацевтических ингредиентов. Возможность выбора нескольких конкретных длин волн обеспечивает максимальное поглощение веществ на заданной длине волны, улучшая идентификацию.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Для реализации данной методики использовался жидкостной хроматограф SCION LC 6000 с диодно-матричным детектором (DAD).

Программное обеспечение CompassCDS использовалось для контроля аналитического процесса, включая сбор данных, их интерпретацию и отчет о результатах.

Калибровочные стандарты, содержащие как ибупрофен, так и парацетамол, были приготовлены в следующих концентрациях: 10, 50, 100, 200 и 400 мг/л в метаноле. Одну таблетку каждого препарата раство-

ряли в 100 мл подвижной фазы (буфер фосфорная кислота / метанол в соотношении 30:70), обрабатывали в ультразвуковой бане и добавляли еще 100 мл подвижной фазы. Далее образцы центрифугировали в течение 10 минут при скорости 3000 оборотов в минуту, а затем фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Приготовленные образцы переносили в виалы автоподатчика SCION LC 6000.

В случае проведения определения парацетамола и ибупрофена в образцах крови нужно провести предварительную экстракцию растворителем. Условия для проведения анализа на хроматографе SCION LC 6000 можно увидеть в таблице 1.

Таблица 1. Аналитические условия HPLC-DAD

Table 1. Analytical Conditions of HPLC-DAD

Условия проведения анализа **Conditions**	
Колонка Column	C18 250 мм × 4,6 мм, 5 мкм C18 250 mm × 4.6 mm, 5 microns
Температура Temperature	25 °C
Элюент Mobile phase	A: фосфатный буфер B: метанол A: phosphate buffer B: methanol
Градиент Gradient	0–6 мин: B – 70 % 6.1–15 мин: B – 90 % 0–6 min: B –70 % 6.1–15 min: B – 90 %
Скорость потока Flow rate	1 мл/мин 1 ml/min
Параметры детектора Detection	220-400 нм Ибупрофен: 237 нм Парацетамол: 254 нм 220-400 nm Ibuprofen: 237 nm Paracetamol: 254 nm
Объем вводимой пробы Injection volume	20 мкл 20 µl

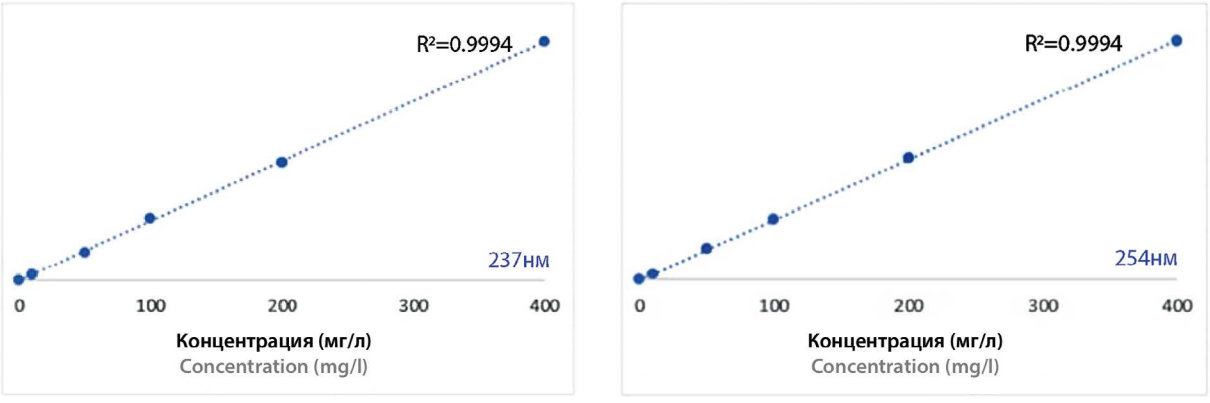
РЕЗУЛЬТАТ

Линейность ВЭЖХ системы тестировали с помощью приготовленных аналитических стандартов ибупрофена и парацетамола в диапазоне 10–400 мг/л. Оптимальные длины волн для ибупрофена и парацетамола задавались на детекторе с диодной матрицей. На рисунке 1, А показана калибровочная кривая ибупрофена при длине волны 237 нм, на рисунке 1, Б показана калибровочная кривая парацетамола при длине волны 254 нм.

ВЭЖХ SCION продемонстрировала превосходную линейность в диапазоне концентраций 10–400 мг/л для обоих целевых соединений, каждое со значением R^2 0,9994. В соответствии со стандартами калибровки был проанализирован образец, содержащий экстракты таблеток ибупрофена и парацетамола. На рисунке 2 показаны сложенные хроматограммы обоих целевых соединений при их конкретных длинах волн.

Ибупрофен имеет максимальное поглощение при длине волны 237 нм, а парацетамол – при 254 нм. Использование многоволновой способности детектора с диодной матрицей позволило обнаружить оба целевых соединения за одну инъекцию менее чем за 12 минут. Концентрацию обоих целевых соединений определяли по соответствующим калибровочным кривым. Количественные значения концентрации ибупрофена составили 34,11 мг/л, а парацетамола – 39,24 мг/л.

Для дальнейшей идентификации и уверенности в результатах спектры поглощения целевых соединений также сравнивали со спектральной библиотекой. На рисунке 3, А показано сравнение спектров поглощения образца ибупрофена со спектрами стандарта ибупрофена, а рисунке 3, Б показано сравнение спектров поглощения образца парацетамола и стандарта парацетамола.



А
A

Б
B

Рисунок 1. Калибровочные кривые:

А – калибровочная кривая ибупрофена при длине волны 237 нм; Б – калибровочная парацетамола при длине волны 254 нм

Figure 1. Calibration curves:

A – calibration curve of ibuprofen at 237nm; в – calibration curve of paracetamol at 254nm

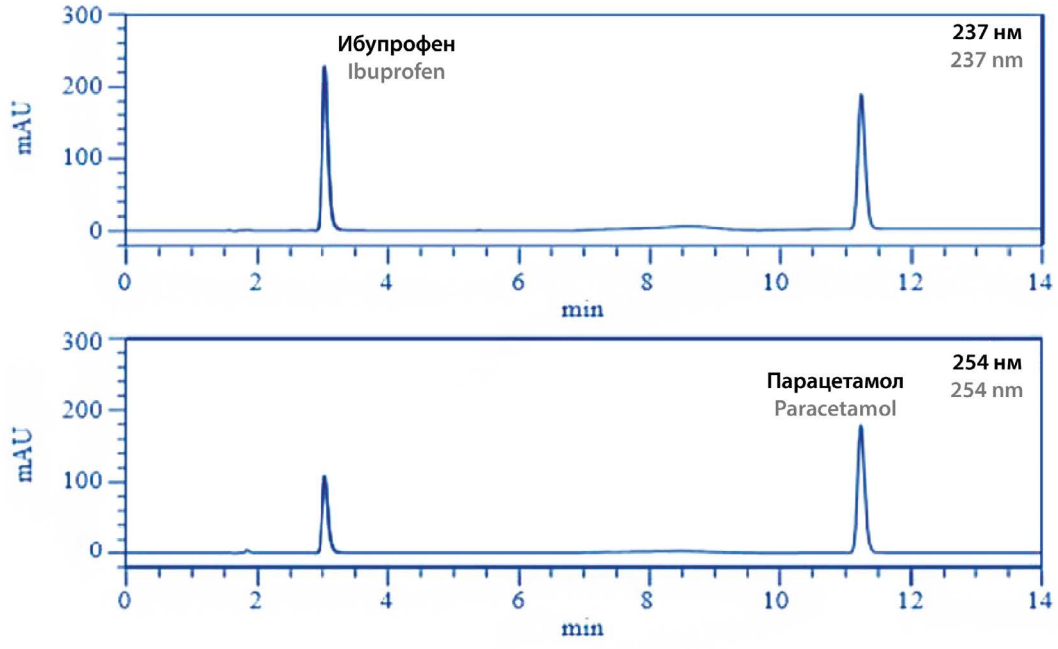


Рисунок 2. **Суммарная хроматограмма целевых соединений**

Figure 2. **Stacked chromatogram of target compounds**

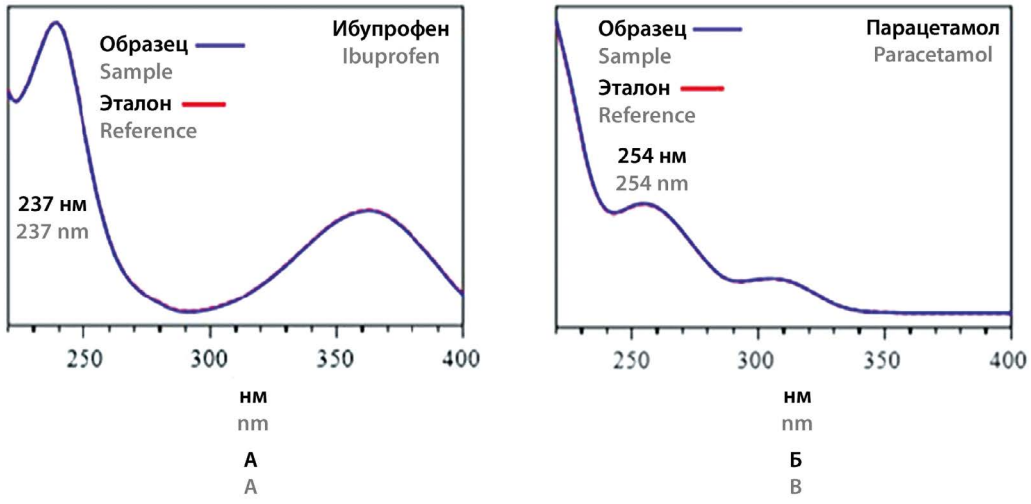


Рисунок 3. **Сравнение спектров поглощения образцов:**

А – сравнение спектров поглощения ибупрофена; Б – сравнение спектров поглощения парацетамола

Figure 3. **Comparison of absorption spectra of samples:**

A – absorbance spectra comparison of Ibuprofen; B – absorbance spectra comparison of paracetamol

Программное обеспечение CompassCDS использовалось для сравнения полученных спектров с данными библиотек, в данном случае использовалась собственная справочная библиотека. На рисунках 3, А и Б показано наложение спектров поглощения, полученных при анализе образца и при анализе эталонного стандарта, в котором ибупрофен и парацетамол продемонстрировали 100 % совпадение, что подтверждает положительную идентификацию обоих целевых соединений (спектры образца наложены на спектр эталона, совпадение составляет 100 %, эталонные спектры не видны). Для гарантии точных и сходимых результатов были выполнены шесть последовательных вводов калибровочного стандарта 10 мг/л. На рисунке 4 показаны наложенные хроматограммы для ибупрофена и для парацетамола.

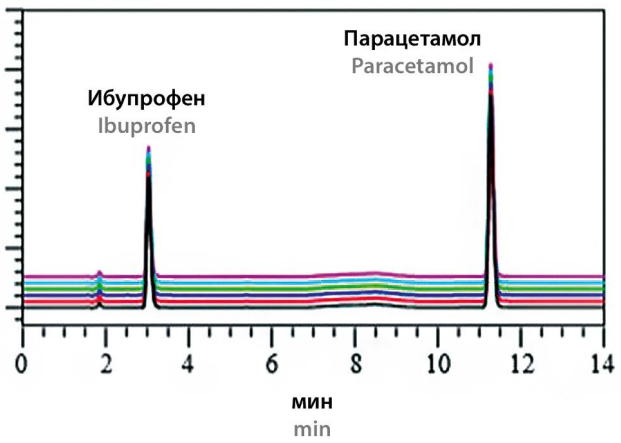


Рисунок 4. Наложение хроматограмм для стандартных образцов 10 мг/л

Figure 4. Overlay of 10mg/L analytical standard chromatograms

Наблюдалась превосходная воспроизводимость для стандартного образца с концентрацией 10 мг/л в течение шести последовательных инъекций; с RSD 0,27 % для ибупрофена при 237 нм и 0,18 % для парацетамола при 254 нм. Время удерживания также было стабильным и воспроизводимым со значениями RSD 0,06 % и 0,04 % соответственно. Наблюдаемая превосходная воспроизводимость и линейность демонстрируют надежность системы ВЭЖХ SCION LC6000.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компания SCION Instruments разработала быстрый и точный метод одновременной идентификации и количественного определения комбинированных препаратов с помощью ВЭЖХ-DAD. Этот метод имеет решающее значение для многих отраслей промышленности, включая фармацевтику и токсикологию. С помощью одной инъекции при использовании многоволновых возможностей диодного матричного детектора стало возможным четко разделить ибупрофен и парацетамол, два широко используемых безрецептурных препарата менее чем за 12 минут. Идентификация соединения дополнительно подтверждалась сравнением спектров поглощения с использованием CompassCDS. Превосходная линейность и повторяемость SCION HPLC-DAD были продемонстрированы низкими значениями RSD и высокими значениями R^2.

scion INSTRUMENTS

АВРОРА
ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ

LC 6000

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФ



- Модульный хроматограф на базе 4-канального градиентного/изократического насоса
- 4 детектора:
  - рефрактометрический
  - УФ
  - диодно-матричный
  - флуоресцентный
- Уникальный режим низкого давления для снижения пульсации жидкостей и улучшения точности и воспроизводимости анализа
- Максимально низкое перекрестное загрязнение образцов
- Термостат на 3 колонки

ГАЗОВАЯ И ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОТ ЕВРОПЕЙСКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Scion Instruments – компания, объединившая в себе технологии и опыт компаний Bruker и Varian

Компания «АВРОРА» - официальный представитель Scion Inst. в России и Республике Беларусь

www.avrora-analyt.ru

Узнать больше

Рекламная статья / Sponsored article

Нержавеющая сталь или пластик. Какое решение выбрать для биофармацевтического производства?

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке компании ООО «БИОТЕХНО»

Эксперты ГК «БИОТЕХНО» – технический директоро ООО «БИОТЕХНО», Беневоленский Максим Сергеевич и руководитель проектов, Никулин Артем Евгеньевич, – поделились своей экспертизой в сфере подбора технологического оборудования на этапе проектирования биофармацевтического производства. Эксперты рассказали о том, какими критериями необходимо руководствоваться на этапе принятия решения о выборе оборудования из нержавеющей стали или из пластика. Сравнили экономическую целесообразность применения различных типов решений в зависимости от производимого продукта, а также поделились опытом зарубежных коллег в аналогичных ситуациях. Эксперты рассказали о существующих на сегодняшний день барьерах в применении одноразовых решений и возможных способах их преодоления.

Stainless Steel vs Single-use. What is Better for Biopharmaceutical Production?

This article was prepared with the financial support of "BIOTECHNO" LLC

Biotechno group of companies' experts – Maxim Benevolensky (Technical director) and Artem Nikulin (Chief of projects) – share their expertise in the topic of technological equipment choice which is usually made at the stage of biopharmaceutical production concept project. The experts told us about criteria that must be taken into account while choosing between stainless steel and single-use solution. They also compared economical efficiency of using different solutions for different products and then shared BIOTECHNO's foreign colleagues' experience in this area. In the end of our interview Maxim and Artem mentioned some barriers that exist when using stainless steel solutions and the ways to overcome these barriers.



Никулин Артем Евгеньевич, руководитель проектов ООО «БИОТЕХНО»

Эксперт в сферах:

- **биотехнология, включая разработку и внедрение новых биотехнологических продуктов (биотопливо, антибиотики, полимолочная кислота, средства защиты растений, ферменты, механо-зависимый фактор роста);**
- **технологическое сопровождение и подбор оборудования для фармацевтики и биотехнологии, от лабораторного до пилотно-экспериментального и промышленного масштаба;**
- **организация и проведение научных экспериментов с целью разработки новых технологических решений и нового биотехнологического оборудования**



Беневоленский Максим Сергеевич, технический директор ООО «БИОТЕХНО»

Эксперт в сферах:

- **промышленная биотехнология;**
- **технологическое сопровождение и подбор оборудования для проектов асептического производства в фармацевтике и биотехнологии;**
- **С 2009 г возглавляет Группу компаний «БИОТЕХНО»**

Какие решения на сегодняшний день определяют тенденции в технологиях культивирования на биотехнологических производствах?

Для начала следует различать, во-первых, сферы применения оборудования, во-вторых, тип продуцента (микроорганизмов или культуры клеток), который будет культивироваться на данном оборудовании. Также важно понимать рынки, на которые нацелен предполагаемый продукт. Поскольку биотехнология является достаточно широкой отраслью, можно говорить и про агробиотехнологию с дешевыми финальными продуктами, и про дорогие нишевые продукты в фармацевтике.

Глобально всю фармпродукцию можно разделить на получаемую химическим либо биологическим синтезом. Продуцентами в биологическом синтезе могут быть прокариоты и эукариоты. До недавнего времени прокариотические системы были основными продуцентами при получении биотехнологической продукции в фармацевтике. Теперь можно смело утверждать, что в последнее время эукариотические системы начали вытеснять прокариот, т.к. способы культивирования эукариот значительно упростились. Эукариоты, являясь клетками животных, более близки к человеческой сфере, чем прокариотические системы. Стимул развития такому синтезу дала перфузионная технология культивирования, которая значительно повысила эффективность данных продуцентов.

Важным показателем также является процесс downstream (очистки и выделения продуктов), который гораздо проще, чем при использовании прокариот как продуцентов.

Чем обусловлен выбор оборудования для биотехнологического производства?

Первый важный параметр – экономическая целесообразность, т. е. рентабельность процесса. Также есть определенные технические ограничения, которые присутствуют при использовании любого оборудования. Что касается продуктов, производимых крупносерийными партиями, десятками миллионов доз, – в таких случаях целесообразно использовать нержавеющее оборудование, так как операционные затраты будут значительно ниже, чем в случае с одноразовыми решениями. Чаще всего такими объемами производятся вакцины либо различные терапевтические белки.

Если говорить о нишевых или контрактных производствах, где предусмотрена частая смена производимых продуктов, в определенных случаях имеет смысл использовать одноразовые системы. Это снижает временные затраты на переквалификацию участка и его перенастройку. Стоимость расходных материалов при таких решениях не оказывает такого сильного влияния на стоимость готового продукта, как при массовом производстве, так как эта стоимость очень высока.

Есть ли ограничения по возможностям работы с различными культурами на одноразовом оборудовании по сравнению со стерилизуемым?

Есть определенные сложности для прокариотических клеток, требующих достаточного интенсивного перемешивания и массообмена. В одноразовых системах это организовать достаточно сложно либо очень дорого. Есть также определенные сложности при работе с продуцентами, растущими на микроносителях. Мощности аппаратов на одноразовых системах имеют ограничения, что, в свою очередь, ограничивает получение готового продукта.

Существуют также отдельные белки, которые могут проявлять чувствительность к компонентам нержавеющей стали. Но это достаточно редкое явление для того, чтобы его считать ограничением.

Какое влияние могут оказывать пластиковые решения на культивируемые в них продукты?

Полимерный материал по своей природе, а также из-за использования при производстве агентов и пластификаторов, имеет свойство выделять в культуральную жидкость химические вещества. В процессе биосинтеза культуральная жидкость контактирует с пластиком и это может вызывать экстракцию и выщелачивание многочисленных компонентов одноразовых систем культивирования. Контроль за экстрагируемыми и выщелачиваемыми веществами – отдельная глобальная задача. Ведь выделяемые вещества, попадая в поток биофармацевтического процесса, могут оказывать влияние на конечного потребителя фармпродукции. Нержавеющая сталь – более инертный материал в сравнении с полимерным материалом одноразовых систем.

Какие решения наиболее выгодны для лабораторных объёмов – стерилизуемые или одноразовые?

Существуют одноразовые решения для лабораторных применений. Но чаще всего сейчас в лабораториях используются стеклянные аппараты, из которых дальше можно двигаться как в «нержавеющую», так и в «пластиковую» сторону. Использование нержавеющего оборудования в лабораториях встречается достаточно редко. При этом обычно после использования пластикового оборудования в лабораториях дальнейшее расширение происходит также на пластике. Следует также учитывать использование разных систем перемешивания и термостатирования. У больших пластиковых аппаратов это либо качалки, либо стаканы (в зависимости от предварительной отработки процесса). Масштабирование, как правило, происходит с применением отработанных в лаборатории процессов.

Опыт показывает, что любой переход от лаборатории к следующему шагу (будь то пилотное или промышленное производство) – это вопрос, требующий отдельного решения. Простого линейного перехода чаще всего не бывает ни в одном из решений. Причина в разности принципов перемешивания и термостатирования, а также в свойствах материалов, из которых изготовлено оборудование. Живая система, находясь в аппарате, реагирует на все внешние воздействия.

Как руководителю проекта решить, какую технологию положить в основу производства?

В этом решении необходимо учитывать множество факторов, основные из которых – экономическая целесообразность и безопасность с точки зрения доступности комплектующих и расходных материалов, а также сроки их поставки.

Многое зависит от того, как технология приходит на производство. Это может быть трансфер технологии, может также быть заграничный трансфер,

в котором уже выбрано решение. В этом случае производство зависимо от того, на каких условиях происходит трансфер. Условия могут достаточно жестко регулировать решения, на которых должно быть основано производство.

Еще есть одна серьезная проблема, связанная с проектированием. Сейчас на рынке существуют компании, предлагающие экономичные решения в сфере проектирования, в результате не дающие эффекта и ведущие к увеличению сроков строительства и финансовым потерям заказчика. Эта тенденция, в свою очередь, привела к обесцениванию этапа проектирования, а ведь все решения будущего производства закладываются на стадии проектирования, когда можно обсуждать и стальные, и одноразовые, и гибридные решения. Отсюда вывод – правильные решения лучше принимать на стадии проектирования.

В прошлом году остро стоял вопрос дефицита одноразовых компонентов для лабораторий. Как с этим обстоят дела сейчас?

На сегодняшний день ситуация, к сожалению, не улучшилась, а во многом наоборот стала хуже. Если раньше это был реальный либо искусственно создаваемый поставщиками дефицит, то эту ситуацию можно было назвать рыночной. Сейчас она осложнилась политическими моментами, и многие из необходимых товаров находятся в санкционных кодах. Безусловно, для решения проблемы предпринимаются попытки оптимизировать логистику. При этом успешность проекта, рассчитанного на эксплуатацию в течение 10–20 лет при условии, что стабильность поставок ключевых расходных материалов изначально вызывает сомнения, весьма сомнительна**.**

Что делать предприятиям, которые используют одноразовые решения на стальных рамах? Можно ли сейчас перестроить технологический процесс?

Перестроить процесс можно. Это, безусловно, повлечет определенные затраты. Для таких случаев нами разработана концепция, по которой мы убираем одноразовую часть и адаптируем существующее решение под нержавеющее оборудование. Концепция предусматривает сохранение технологических режимов заказчика. Таким образом технологические контроллеры, а также все параметры и настройки, которыми привыкли пользоваться заказчики, остаются прежними. Фактически мы меняем культуральный сосуд и добавляем опцию, которая связана с мойкой и стерилизацией на месте. На многих предприятиях, где используются одноразовые решения, все равно есть пар, вода и все необходимые реагенты. Наши решения предполагают подключение к уже существующим магистралям. Предлагаемая концепция не требует перестройки общих коммуникаций, перепланировки цеха и прочих серьёзных изменений. Замена одноразовых систем на стальные – в действительности достаточно бюджетное решение.

Изначально при планировании производства и подборе оборудования, заказчик находится в парадигме того, что «железное» решение дороже, чем «одноразовое». В действительности, это глубокое заблуждение. Мы сравнили по стоимости «одноразовое» решение немецкого производителя и наше решение – полный аналог первого, только в «нержавеющем» исполнении. Расчет показал, что даже первоначальная стоимость оборудования из нержавеющей стали (CAPEX) оказалась ниже. А ведь одноразовая система за 2–3 года удваивается в затратах. Миф о выгодности одноразового оборудования во многом создан и успешно культивируется маркетинговой стратегией поставщиков одноразовых решений.

Поможет ли замена производителя одноразовых мешков преодолеть их дефицит?

Все пластиковые компоненты характеризуются тем или иным уровнем диссоциации или выщелачивания определенных веществ, которые выходят в среду. Невозможно мешок одного производителя просто взять и заменить на другой, т. к. предварительно надо проводить эксперименты на реагирование компонентов среды с новым мешком.

Мы уже наблюдали опыт замены мешков одного производителя на другого производителя у некоторых коллег. Он не показал своего успеха и, к сожалению, культивирование не пошло.

Нержавеющая сталь химически нейтральна по умолчанию и лишена таких недостатков. По этой причине подавляющее большинство вакцин в мире производится на нержавеющих решениях.

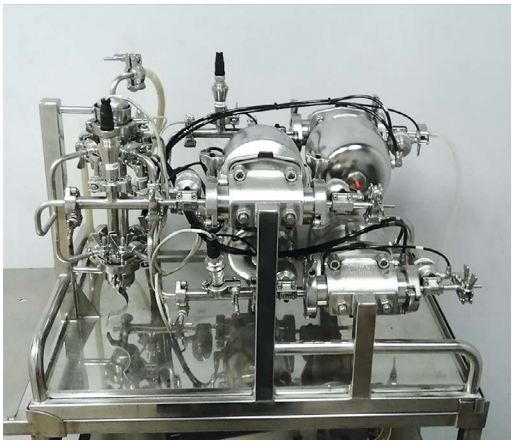
Многие пользователи одноразовых реакторов в условиях западных санкций склоняются к решению о закупках в Азии. Но тут, естественно, нужно ответить на вопросы – из какого материала будут сделаны новые реакторы? Как они будут сделаны и склеены? Какие компоненты для этого использовались и насколько безопасным будет финальный продукт?

Возвращаясь к обсуждению выбора наиболее подходящего решения, выбирать надо также, исходя из рыночного применения. Если нам необходимо произвести 100 000 доз моноклонального антитела при стоимости курса лечения в 50 тыс. долларов или евро, то в этом случае стоимость мешка, безусловно, будет незначительной. Если говорить о вакцинах массового производства, при котором доза должна стоить 1–2–3 доллара или 50–150 рублей, то в таком случае стоимость мешка может убить всю «экономику» на корню.

В результате поставок оборудования в Китай и общения с китайскими коллегами мы узнали, что китайские производственники пришли к решению отказаться от пластикового оборудования при производстве стратегически важных продуктов. Такая стратегия китайских коллег обусловлена нежелательными привязками, а также экономическими и политическими рисками. В Китае сейчас реализуется программа по многократному повышению доступности препаратов на основе моноклональных антител. Для достижения желаемых результатов при таком уровне производства мешки не рассматриваются вообще. В расчеты закладываются биореактора объемом 15–20–25 кубометров и это, в любом случае, нержавеющее оборудование.

Оборудование из нержавеющей стали целиком производится в России или есть импортные комплектующие? Каковы риски непоставок комплектующих?

В сегодняшней ситуации ГК «БИОТЕХНО» как производитель тоже находится в зоне риска, закупая большими объемами комплектующие за рубежом.



Система перфузионной фильтации БИОТЕХНО

Разница же между нашим оборудованием и одноразовым заключается в том, что одноразовое поставляется целиком как единица оборудования. В этом случае распространена ситуация, что оборудование заказано, оплачено, но не отгружено заказчику. Очевидно, что это риск 100 %. В случае со стальным оборудованием возможны альтернативы. Если одни комплектующие становятся недоступны, мы находим им замену, переключаясь на другие возможные решения, которые мы можем привезти и интегрировать. Это может осложняться логистикой, что влияет на конечную стоимость. Возможны дополнительные инженерные проработки. Но при этом отсутствует риск того, что проект не будет реализован вовсе. Да, эти дополнительные мероприятия могут задержать его реализацию на 5–10 % и изменить стоимостные параметры, но не обязательно в большую сторону.

При сегодняшней высокой степени локализации производств клапанных конструкций и микроэлектроники у производителей оборудования, в особенности у конструкторов, выработалась привычка использовать одну клапанную сборку, заменяющую сразу 5–6 клапанов. Это удобно. Сейчас такая клапанная сборка может быть недоступной из-за санкций. В этом случае мы можем сгенерировать и применить новое решение. В нержавеющем оборудовании нет незаменимых компонентов. В сравнении с одноразовым оборудованием, это выглядит так: у вас есть держатель, но нет мешка, – вы не можете его заменить другим пластиковым решением, т. к. это влечет необходимость ревалидации процесса, что занимает немало времени. При заказе нержавеющего оборудования, в случае возникновения дефицита компонентов, мы без больших потерь меняем одного производителя на другого.

Как вы оцениваете конкурентоспособность ГК «БИОТЕХНО»?

Мы уверены в своей конкурентоспособности. Быть уверенными нам позволяет множество успешных проектов, реализованных в Европе, в Китае, в Таиланде и не только, где приходилось конкурировать не с местными производителями, а с мировыми лидерами отрасли.

Важный момент, ограничивающий любую компанию, которая занимается разработками современных отечественных решений, – это отсутствие у инженеров возможности общения с конечным пользователем. Если конечный пользователь закрыт для общения с инженером, откуда инженеру брать знания о том, что же надо конечному пользователю? Еще 10 лет назад техническое задание от заказчика звучало приблизительно так: «хочу ферментер на 30, 100 или 1000 литров». Благодаря работе в международных проектах, мы обрели бесценный опыт. ТЗ наших зарубежных заказчиков занимало 100–150 страниц, на которых были детально описаны все требования к оборудованию. Многие российские компании уже пришли к составлению достаточно подробного и понятного для инженеров ТЗ. Тем не менее, закрытость пользователей от потенциальных поставщиков без преувеличения можно назвать критичной ситуацией. Инженеры не могут знать нужд и потребностей конечного пользователя, если они не будут озвучены пользователем. Нам известно, что эта проблема сейчас есть во многих отраслях, где необходимо производить замену решений. Участие в международных проектах позволило нам «перепрыгнуть этот забор», благодаря чему мы имеем высокий уровень компетенций.

Что вы хотите пожелать сегодняшним представителям биотехнологической и смежных отраслей?

В нынешней ситуации можно пожелать терпения и удачи. Не стоит переживать. Вместе, как отрасль, мы найдем решение для всех возникших вопросов. Сегодня у нас в стране нет развернутых структур, готовых решать сходу все задачи. Но мы знаем свои точки роста, работая над которыми, сможем создавать структуры, способные закрывать все проблемные вопросы.

О компании

Компания БИОТЕХНО осуществляет проектирование и производство оборудования для биотехнологических, фармацевтических, химических и пищевых производств, для любых стерильных и гигиенических применений, в том числе для чистых помещений.

Ассортимент включает отдельные единицы оборудования, производственные линии, а также полное оснащение производственных процессов микробной ферментации и культур клеток, включая CIP, фильтрационное, сепарационное оборудование, сушилки, периферийные и вспомогательные устройства, запчасти и сервис.

За более чем 15 лет ГК «БИОТЕХНО» стала современной сервисной и производственной компанией с командой компетентных высоко мотивированных профессионалов и большим опытом поставок по России и СНГ. Мы реализовали более 150 проектов по всей России и в странах СНГ, при этом поставили более 700 единиц оборудования.

Мы понимаем рынок биотехнологий и поставляем качественное и современное оборудование для производств и научно-исследовательских институтов.



BIO Group Techno
engineering & consulting

КОМПЛЕКСНЫЕ ПОСТАВКИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

ФЕРМЕНТЕРЫ | **БИОРЕАКТОРЫ** | **СЕПАРАЦИЯ**

ФИЛЬТРАЦИЯ | **СУШИЛКИ**

117587, г. Москва, ул. Днепропетровская, д. 2
moscow@biotechno.ru
www.biotechno.ru

8(800) 222-88-10
+7 (495) 925-3453
+7 (495) 995-0565

Информационная статья / Informational article

Международный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» состоится 1–2 декабря в Москве

Вас ждет двухдневная насыщенная деловая программа, круглые столы и мастер-классы. В рамках мероприятия мы обсудим вопросы фармацевтической разработки, исследований, производства оригинальных и воспроизведенных ЛС, а также регуляторные аспекты действующего законодательства ЕАЭС.

International congress "Drug development and registration" will be held on December 1–2 in Moscow

A two-day rich business program, round tables and master classes are waiting for you. During the event, we will discuss issues of pharmaceutical development, research, production of original and generic drugs, as well as regulatory aspects of the current legislation of the EAEU.



УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодном международном конгрессе *«Разработка и регистрация лекарственных средств»*, посвященном 10-летнему юбилею одноименного журнала!

В этом году состоится знаковое для всех нас событие – международному рецензируемому журналу «Разработка и регистрация лекарственных средств» исполняется 10 лет! На сегодняшний день журнал является единственным российским фармацевтическим изданием, входящим в Q3 Scopus!

В честь этого события мы подготовили для Вас уникальное по своему наполнению мероприятие – Вас ждет двухдневная насыщенная деловая программа, круглые столы и мастер-классы.

Наши докладчики – ведущие специалисты из стран ЕАЭС и других дружественных государств: представители фармацевтической индустрии, научного сообщества и регуляторных органов.

К участию в конгрессе приглашаются специалисты фармацевтических предприятий-производителей, сотрудники отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудники лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений, а также топ-менеджеры фармацевтических компаний.

В программе конгресса:

- вопросы фармацевтической разработки оригинальных и воспроизведенных химико-фармацевтических и биологических ЛС;
- доклинические и клинические исследования оригинальных и воспроизведенных химико-фармацевтических и биологических ЛС;
- актуальные вопросы надлежащих практик GxP в жизненном цикле ЛС;
- регуляторные вопросы действующего законодательства ЕАЭС;
- технология получения лекарств (в т. ч. разработка новых отечественных препаратов из биологического сырья).

Планируется проведение сателлитных круглых столов:

- вопросы надлежащей публикационной практики и подготовки статей международного уровня;
- круглый стол по вопросам оценки биоаналогичности *in vitro* и *in vivo* препаратов гепаринов и их аналогов;
- круглый стол по вопросам GLP с проведением видео-аудита лаборатории, в котором каждый слушатель сможет принять личное участие.

Дата: 1–2 декабря 2022 (2 дня)

Место: Технопарк Калибр, г. Москва, ул. Годовикова, дом 9, стр. 17 (м. Алексеевская).

Организаторы: международный научный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» и «Центр Фармацевтической Аналитики».

По вопросам выступления, партнерства и рекламы – **info@pharmjournal.ru**

Подробности и регистрация на сайте **http://rrls-congress.ru/**

Информационная статья / Informational article

VII Всероссийская GMP-конференция: «GxP: единство подходов к надлежащему качеству»

7–8 сентября в городе Иркутск состоится VII Всероссийская GMP-конференция с международным участием. Организатором мероприятия выступает Министерство промышленности и торговли Российской Федерации совместно с ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик», оператор – ЦКК «С-ГРУП». Генеральный партнер – компания «Фармасинтез».

GMP Conference 2022: Good Manufacturing Practices Methods Unity

On September 7–8, the VII GMP Conference with international participation will be held in Irkutsk. The organizers of the conference are the Ministry of Industry and Trade, the Federal State Institution «State Institute of Drugs and Good Practices». The operator is S-Group communication center.

За шесть лет проведения GMP-Конференция надежно зарекомендовала себя как площадка для продуктивного диалога между отраслью и регулятором, стала объединяющей платформой для представителей государственной власти и профессиональных организаций, руководителей фармацевтических производств и экспертов в области надлежащих производственных практик (GMP). С 2016 года в Конференции приняло участие более 6 тысяч человек, а за 2 года проведения в гибридном формате трансляция набрала порядка 20 тысяч зрителей.

ЗАДАЧА КОНФЕРЕНЦИИ – КОНСОЛИДАЦИЯ УСИЛИЙ

В последние годы на Конференции рассматриваются вопросы не только надлежащих производственных практик, но и надлежащих лабораторных, инженерных и других практик (GxP). Кроме этого, в рамках мероприятия проводятся круглые столы и тематические сессии по ветеринарному направлению.

Программа Конференции 2022 года будет посвящена обсуждению актуальных вопросов развития фармацевтической и медицинской отрасли в современных геополитических условиях. А ключевыми станут вопросы качества: как качества организации всех этапов фармацевтического производства, так и качества обеспечения всего жизненного цикла лекарственного препарата.

«Качество – понятие нравственное. А фармацевтическая отрасль всегда была той отраслью промышленности, в которой понятие качества не формальность, а необходимый критерий. В последние годы на российскую фарминдустрию легла повышенная нагрузка. И сейчас наша задача не только консолидировать усилия всех участников рынка для преодоления сложившегося кризиса, но при этом и сохранить высокое качество, безопасность и эффективность производимых лекарственных препаратов», – отметил директор ФБУ «ГИЛС и НП Минпромторга России **Владислав Шестаков**.



Директор ФБУ «ГИЛС и НП Минпромторга России Владислав Шестаков

Director of State Institute of Drugs and Good Practices, Vladislav Shestakov

Среди тематических направлений GMP-Конференции в этом году:

- Принятые государством меры поддержки отрасли с учетом введения ограничений и санкций.
- Функционирование общего рынка обращения лекарственных средств Евразийского экономического союза.
- Гармонизация регуляторных требований ЕАЭС.
- Фармацевтический инжиниринг современного производства.
- Развитие сегмента исследований и разработок (R&D), создание и выведение на рынок новых продуктов.

7 сентября конференция пройдет в очном формате с трансляцией отдельных сессий на сайте www.gosgmp.ru.

ТРАДИЦИОННЫЙ МАСТЕР-КЛАСС

Особое внимание отрасли заслужили практические мастер-классы, в рамках которых проходят разборы реальных кейсов с фармацевтических производств, инспекций, открытый разговор представителей регулятора и фармсообщества. 8 сентября в рамках VII Всероссийской GMP-конференции с международным участием состоится развернутый мастер-класс по надлежащим производственным практикам и проведению GMP-инспекций.

Данный формат сегодня признан одним из самых эффективных инструментов, позволяющих приобрести практические навыки и пополнить базу знаний. Это особенно важно в такой быстроразвивающейся и высокотехнологичной области, как фармацевтика и обеспечение качества фармацевтического производства. Именно поэтому мастер-классы, которые стали неотъемлемой частью ежегодной GMP-конференции, пользуются большой популярностью среди представителей фармкомпаний.

В мастер-классе примут участие ведущие эксперты отрасли. В условиях сложившейся геополитической ситуации и введения ряда мер, упрощающих процесс регистрации и ввода в гражданский оборот лекарственных средств, именно руководство предприятия должно уделять особое внимание анализу функционирования фармацевтической системы качества, чему и будет посвящена теоретическая часть мастер-класса.

Практическая часть мастер-класса будет представлять собой игровой квест, в котором примут участие несколько команд – как от инспектората, так и от представителей фармацевтических компаний. Командам будут предложены различные задания на знание правил GMP ЕАЭС и разбор несоответствий в игровой форме: от шуточных ребусов до решения реальных ситуационных задач. Задания квеста будут дополнены интерактивными элементами, включая применение геймификации, мультимедийных карт, видео-вопросов и других игровых механик. Такой игровой подход в освоении правил GMP в дальнейшем фармацевтические компании смогут применить внутри своих обучающих процессов на производстве. Интерактивная часть пройдет при поддержке компании «Валента Фарм».



Мастер-класс GMP-конференция 2021

Master class of GMP Conference 2021



Сессия GMP-конференции 2021

GMP Conference session 2021

Участие в мастер-классе возможно только в очном формате, для этого необходимо зарегистрироваться на сайте мероприятия.

К участию приглашаются ведущие эксперты фармацевтической и медицинской отраслей, представители федеральных и региональных органов власти, профильных ассоциаций и сообществ, научно-исследовательских и испытательных центров, компаний-производителей, специалисты в области инжиниринга, качества и надлежащих практик, а также все, кому интересна тематика мероприятия.

Партнерами VII Всероссийской GMP-конференции с международным участием выступают:

- Генеральный партнер: «Фармасинтез».
- Стратегические партнеры: «Биннофарм Групп», «Р-ФАРМ».
- Партнер интерактивной части мастер-класса: «Валента Фарм».
- Партнеры сессий: «ПРОМ.МЕДИК.РУСЬ.», «АКРИХИН», Sun Pharma и «Фармэко».
- Партнер ветеринарной сессии: «АВФАРМ».
- Специальные партнеры: «Босналек», «Нацимбио», «ПРО GMP» и «Сотекс».
- Партнер конференции: «МАКИЗ-ФАРМА».
- Партнер онлайн выставки: «Акелон».

Сайт GMP-конференции: www.gosgmp.ru

Адрес проведения мероприятия: г. Иркутск, улица Байкальская, д. 279, отель «Байкал Бизнес-Центр».

По вопросам участия в GMP-конференции:
Центр корпоративных коммуникаций «С-ГРУП».
Тел.: +7 (495) 120-53-33.
email: conference@sgr.com.ru.

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

ГИЛС и НП

GMP

VII ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP - КОНФЕРЕНЦИЯ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

7–8 СЕНТЯБРЯ, ИРКУТСК

БАЙКАЛ БИЗНЕС ЦЕНТР

УЛ. БАЙКАЛЬСКАЯ, 279

ПРОГРАММА:

7 СЕНТЯБРЯ – СЕССИОННЫЙ ДЕНЬ

8 СЕНТЯБРЯ – МАСТЕР-КЛАСС

МЕРОПРИЯТИЕ ПРОЙДЕТ В ОЧНОМ ФОРМАТЕ
С ОНЛАЙН ТРАНСЛЯЦИЕЙ ОТДЕЛЬНЫХ СЕССИЙ.
РЕГИСТРАЦИЯ ОТКРЫТА НА САЙТЕ: **WWW.GOSGMP.RU**

Информационная статья / Informational article

Разработку лекарственных средств, возрастозависимые заболевания и перспективы отечественной науки обсудят на OpenBio-2022

С 27 по 30 сентября в наукограде Кольцово Новосибирской области в девятый раз пройдет площадка открытых коммуникаций в сфере вирусологии, биотехнологий и биофармацевтики OpenBio. В программе OpenBio – трехдневная конференция молодых ученых, выставка достижений биотехнологических компаний и научно-деловой форум с дискуссиями по вопросам долголетия, разработке лекарств и реагентов, борьбе с возрастозависимыми заболеваниями, противодействия распространению ВИЧ-инфекции, импортозамещения и перспективам инвестирования в наукоемкий бизнес в современных реалиях.

The development of medicines, age-related diseases and the prospects for domestic science will be discussed at OpenBio-2022

From September 27 to 30, the science city of Koltsovo, Novosibirsk Region, will host the OpenBio platform for open communications in the field of virology, biotechnology, and biopharmaceutics for the 9th time. The OpenBio program will include a three-day conference of young scientists, an exhibition of achievements of biotechnology companies and a scientific and business forum with discussions on longevity, the development of medicines and reagents, the fighting of age-related diseases, preventing the spread of HIV infection, import substitution and the prospects for investing in science-intensive business in modern realities.



С 27 по 30 сентября в наукограде Кольцово Новосибирской области в девятый раз состоится «OpenBio-2022» – отраслевой комплекс мероприятий, посвященный развитию наукоемкого бизнеса и новейших научных исследований в сфере биотехнологий, биофармацевтики и вирусологии. OpenBio, одно из самых масштабных отраслевых событий в России, которое вносит большой вклад в реализацию научного потенциала нашей страны. В этом году мероприятие будет проходить в комбинации офлайн и онлайн-форматов.

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

На конференции молодые ученые из разных регионов представят новейшие исследования и разработки в следующих областях: биотехнология, вирусология, молекулярная биология, биофизика, биоинформатика.

В этом году впервые в самостоятельную секцию выделены работы исследователей в сфере биоинформатики. Для участия в этой секции организаторы приглашают ученых, которые занимаются исследованиями на основе анализа больших данных биологических и биохимических систем с использованием компьютерных, математических и статистических методов.

УСТАНОВОЧНЫЕ ЛЕКЦИИ ИЗВЕСТНЫХ УЧЕНЫХ

В каждой секции перед молодыми исследователями выступят с установочными лекциями ведущие российские ученые.

Сергей Альховский, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии Института вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ прочтет лекцию *«Истоки пандемии COVID-19: Экология и геномика SARS-подобных коронавирусов летучих мышей»*.

«Это ближайшие родственники и предшественники вирусов SARS-CoV SARS-CoV-2, которые уже дважды с начала XXI века вызвали вспышку и пандемию новой инфекции человека. Все вирусные инфекции человека изначально были зоонозами, которые однажды смогли преодолеть межвидовой барьер и «выплеснулись» из своего природного резервуара. На примере SARS-CoV-2 и пандемии COVID-19 мы можем проследить, какие факторы играют основную роль в этом процессе, – объяснил **Альховский**. – Актуальность темы связана с ущербом, который несут человечеству эпидемии и пандемии новых вирусных инфекций. Основной вопрос, который стоит перед вирусологами, – можем ли мы предотвратить в будущем появление новых пандемий или как мы можем с ними эффективно бороться».

В секции «молекулярная биология» **Гузель Ситдикова**, доктор биологических наук, заведующая кафедрой физиологии человека и животных ИФМИБ КФУ (Казань) раскроет тему *«Нейрофизиология боли:*

центральные и периферические механизмы боли при мигрени».

В своей лекции **Ситдикова** расскажет о молекулярно-клеточных механизмах, которые лежат в основе восприятия боли, роли ионных каналов и рецепторов в восприятии повреждающих стимулов, а также о центральных и периферических механизмах боли при мигрени. Она отмечает, что молодым ученым будет интересно познакомиться с методами, с помощью которых исследуют эти механизмы, и сигнальными путями, которые являются мишенью для разработки противоболевых агентов.

ЗДОРОВЬЕ МОЗГА, ИМПОРТОНЕЗАВИСИМОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В МЕДИЦИНЕ

Научно-деловой форум на OpenBio расширяется, и в этом году его площадки пройдут параллельно с сессиями научной конференции. В программе форума дискуссии и круглые столы, которые соберут ученых, разработчиков, инвесторов, а также представителей наукоемкого бизнеса, медицинского сообщества и власти, для обсуждения актуальных вопросов и трендов.

«В последние годы большое внимание на OpenBio уделялось противодействию пандемии COVID-19. В этом сезоне мы переносим фокус на здоровье человека в целом, рассматривая детально целый ряд социально-значимых заболеваний. Мы обсудим здоровье мозга и борьбу с когнитивными нарушениями, возрастозависимые заболевания, трансляционную медицину в онкологии и эпидемию ВИЧ-инфекции. Мы будем говорить о качестве и продолжительности жизни, ведь именно человек является центром всех процессов в любых обстоятельствах», – рассказала **Юлия Линюшина**, руководитель OpenBio.

Продление активного периода жизни и современные подходы к медицине ежегодно обсуждают на самой продолжительной сессии OpenBio «Технологии жизни». Как отмечают модераторы, в этом году внимание будет сфокусировано на научных подходах к продлению жизни. Площадка соберет ведущих ученых из сферы биологии, генетики и молекулярной медицины, а также специалистов в области старения и здоровья мозга. Сессия впервые дополнится дискуссионным форматом – эксперты с участием заинтересованной аудитории обсудят возможности и перспективы доказательной медицины.

Большое внимание в этом году будет уделено российским разработкам, производству лекарственных препаратов и реагентов, перспективам новых методов диагностики и лечения, применению искусственного интеллекта в медицине.

На круглом столе *«Реактивы для Lifescience»* эксперты обсудят тренды развития генетических технологий, потребности лабораторий в сфере lifescience, проблемы нехватки важных реактивов, поиск оптимального пути решения и факторы, которые влияют на их доступность.

«Генетические технологии являются основой для медицинских технологий, разработки диагностических систем и развития ветеринарии и аграрно-производственного комплекса. Мы хотим говорить об этом, чтобы начать формировать единое инфополе, в котором действуют все участники этого сложного комплекса. Это особенно важно сейчас, когда актуален вопрос импортонезависимости», – объяснил модератор круглого стола **Григорий Степанов**, кандидат химических наук, заведующий лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН, директор по развитию «Биолабмикс».

Он отметил, что российские потребители с большим доверием относятся к зарубежным производителям. Однако по мнению эксперта уже накоплен достаточный опыт, который показывает конкурентоспособность продукции российских компаний в области lifescience.

На площадке по интеллектуальной собственности эксперты обсудят успешные кейсы по коммерциализации разработок и особенности патентования в сфере медицины и биотехнологий.

Круглый стол «Реалии российского инвестора: эпоха новых возможностей» соберет представителей инвестиционных фондов, которые поднимут актуальные для современных условий вопросы финансирования проектов и компаний.

В рамках форума впервые пройдет открытая дискуссия *«Наука в России: страхи и перспективы молодых ученых»*, к участию в которой приглашаются молодые ученые, студенты старших курсов высших учебных заведений, представители наукоемкого бизнеса и инвестиционной сферы, ведущие ученые институтов, работающие с молодыми учеными. Участники дискуссии обсудят, с какими преградами сегодня сталкиваются молодые ученые, от чего зависит решение идти в науку после окончания университета и что нужно изменить, чтобы молодые специалисты делали выбор в пользу научной карьеры и развивали ее в России

В этом году мероприятие будет проходить в комбинации офлайн и онлайн-форматов. Вы можете подключиться ко всем площадкам форума и конференции. Для участия в OpenBio-2022 необходима регистрация: https://openbio.ru/

Организатор OpenBio-2022: АНО «Инновационный центр Кольцово» при поддержке Администрации наукограда Кольцово и Правительства Новосибирской области.

Справка: OpenBio проводится в наукограде Кольцово с 2014 года. Главный организатор OpenBio – Инновационный центр Кольцово, при поддержке администрации наукограда Кольцово и Правительства Новосибирской области.

OpenBio-2021 собрал на своих площадках почти 6 тысяч человек из 42 регионов России и 15 зарубежных стран, из них офлайн – 920, онлайн – 5027. На научной конференции OpenBio молодые ученые представили 120 докладов в секциях «Вирусология», «Биофизика», «Биотехнология», «Молекулярная биология» и «Биоинформатика».

27-30 сентября 2022

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО

IX ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ

OPEN BIO

LIFESCIENCE EVENT

БИЗНЕС-ФОРУМ

ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ВИРУСОЛОГИЯ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА, БИОИНФОРМАТИКА

ОТРАСЛЕВАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ

OPENBIO.RU

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56
УДК 57.086.834

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Риск-ориентированный подход при получении и анализе свойств суспензионных культур клеток шлемника байкальского

А. А. Шмарова✉, **Н. С. Пивоварова, О. Н. Абросимова**

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14А

✉ **Контактное лицо:** Шмарова Александра Артёмовна. **E-mail:** shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

ORCID: А. А. Шмарова – https://orcid.org/0000-0002-0191-7342; Н. С. Пивоварова – https://orcid.org/0000-0003-3020-8526; О. Н. Абросимова – https://orcid.org/0000-0002-0274-0139.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 09.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В условиях пандемии использование биологически активных компонентов шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) приобретает особое значение. Ценность растения становится причиной чрезмерной эксплуатации подземных органов шлемника, что приводит к сокращению ареала распространения популяции и ненадлежащих условий сбора и заготовки. Для предотвращения угрозы исчезновения вида перспективной технологией становится культивирование клеток растения в условиях in vitro. Благодаря этому появляются перспективы исследования физиологии и биохимии растительных клеток, направленной регуляции синтеза ценных вторичных метаболитов и создания лекарственных средств без вмешательства в естественную среду обитания. Современные технологии открывают возможности автоматизации культивирования клеток с целью сведения к минимуму вмешательства человека на протекание процесса. Тем не менее, культивирование растительных клеток – вероятностный процесс, зависящий от ряда факторов. Использование инструментов риск-менеджмента позволит снизить число нежелательных последствий, приводящих к опасным и критическим состояниям клеточных культур.

Цель. Анализ рисков, возникающих при культивировании *in vitro* шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi).

Материалы и методы. Объект исследования – суспензионные культуры Scutellaria baicalensis, полученные из рыхлых каллусов растения. Выращивание суспензий клеток шлемника проводили в плоскодонных конических колбах объемом 250 мл в условиях постоянного перемешивания на шейкере (скорость вращения 100 об/мин). Цикл субкультивирования составляет 21 сутки. Для микроскопии клеточной биомассы использовали прижизненный краситель 0,1 % нейтральный красный (НК) и 0,025 % раствор Эванса голубого (ЭГ). Оценку рисков процесса проводили с помощью диаграммы причинно-следственных связей (диаграммы Исикавы).

Результаты и обсуждение. Установлено, что для клеток в суспензионных культурах шлемника характерна вытянутая овальная форма. Первичные суспензии характеризовались наличием клеток преимущественно паренхимного типа (70 ± 2,0 %). Для первичных суспензий характерна крупная агрегированность. Диаметр агрегатов достигал порядка 8–15 мм. Отмечена зависимость ростовых свойств суспензии шлемника байкальского от плотности инокулята. При уменьшении количества пересаживаемой биомассы клетки проявляли склонность к деструкции. Полученные результаты обозначили необходимость анализа рисков лабораторной технологии суспензионного культивирования шлемника байкальского. Выделено пять наиболее значимых факторов при культивировании растительных клеток: качество каллуса, качество приготовленной жидкой питательной среды, исправность и пригодность оборудования, действия оператора и пригодность технологии получения клеточных культур и отбора проб для анализа показателей жизнеспособности биомассы.

Заключение. Предложен алгоритм анализа защищенности суспензионной культуры шлемника байкальского. На основании оценки рисков можно сделать вывод о вероятности нежелательных последствий и их влиянии на процесс. Инструментарий риск-менеджмента создает основу для модернизации существующей технологии и автоматического оснащения процесса.

Ключевые слова: шлемник байкальский, культивирование растительных клеток, суспензионная культура, анализ рисков, критические точки

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

Вклад авторов. Н. С. Пивоварова осуществила постановку задачи. А. А. Шмарова выполнила эксперимент, обработку полученных данных. А. А. Шмарова, Н. С. Пивоварова, О. Н. Абросимова обсудили результаты и написали текст 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: Шмарова А. А., Пивоварова Н. С., Абросимова О. Н. Риск-ориентированный подход при получении и анализе свойств суспензионных культур клеток шлемника байкальского. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):47–56. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56

Risk-based Approach in Obtaining and Analysing the Characteristics of Baikal Skullcap Suspension Cultures

Alexandra A. Shmarova✉, **Nadezhda S. Pivovarova, Olesya N. Abrosimova**

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexandra A. Shmarova. **E-mail:** shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

© Шмарова А. А., Пивоварова Н. С., Абросимова О. Н., 2022
© Shmarova A. A., Pivovarova N. S., Abrosimova O. N., 2022

ORCID: Alexandra A. Shmarova – https://orcid.org/0000-0002-0191-7342; Nadezhda S. Pivovarova – https://orcid.org/0000-0003-3020-8526;
Olesya N. Abrosimova – https://orcid.org/0000-0002-0274-0139.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 09.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The use of biologically active compounds of Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi) becomes especially important under pandemic conditions. The plant's value becomes the cause of overexploitation of the skullcap subterranean parts, which leads to the reduction of the population distribution range and inappropriate conditions of collection and harvesting. To prevent the extinction hazard of the species, in vitro cultivation of the plant's cells becomes a promising technology. This opens up the prospect of studying the physiology and biochemistry of plant cells, regulating the direction of valuable secondary metabolites synthesis and creating medicines without interfering with the natural habitat. Modern technologies provide opportunities to automate cell cultivation in order to minimize human involvement in the process. However, cultivation of plant cells is a probabilistic process that is influenced by a range of factors. The use of risk management tools will reduce the number of unintended consequences leading to dangerous and critical cell culture conditions.

Aim. Risk analysis resulting from in vitro cultivation of Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi).

Materials and methods. The object of the study was suspension cultures of *Scutellaria baicalensis* obtained from loose plant callus. Suspensions of *Scutellaria baicalensis* cells were grown in 250 ml flat-bottomed conical flasks under conditions of constant mixing on a shaker (rotation speed 100 rpm). The subculture cycle was 21 days. For microscopy of cell biomass, we used 0.1 % neutral red (NK) and 0,025 % Evans blue (EG) solution. Process risks were assessed using a cause-and-effect diagram (Ishikawa diagram).

Results and discussion. It was found that the cells in the suspension cultures of skullcap were characterized by an elongated oval shape. Primary suspensions were distinguished by the presence of predominantly parenchymal cells (70 ± 2,0 %). A large aggregation was observed in the primary suspensions. The diameter of the aggregates reached about 8–15 mm. The growth properties of Baikal skullcap suspension depended on the density of the inoculum. As the amount of transplanted biomass decreased, cells showed a tendency to destruction. The results indicated the need for risk analysis of the laboratory technology of Baikal skullcap suspension cultivation. Five most important factors in plant cell cultivation were identified: callus quality, quality of prepared liquid nutrient medium, equipment serviceability and suitability, operator actions, and suitability of cell culture technology and biomass viability index sampling.

Conclusion. An algorithm for analyzing the security of a Baikal skullcap suspension culture is proposed. The risk assessment can be used to make a conclusion about the probability of undesirable effects and their impact on the process. Risk management tools provide the basis for modernization of the available technology and automatic outfitting of the process.

Keywords: baikal skullcap, plant cell culture, suspension culture, risk analysis, critical points

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

Contribution of the authors. Nadezhda S. Pivovarova carried out the formulation of the problem. Alexandra A. Shmarova performed the experiment, processing the data obtained. Alexandra A. Shmarova, Nadezhda S. Pivovarova, Olesya N. Abrosimova discussed the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the CCP "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation" under the agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Shmarova A. A., Pivovarova N. S., Abrosimova O. N. Risk-based approach in obtaining and analysing the characteristics of baikal skullcap suspension cultures. *Drug development & registration*. 2022;11(3):47–56. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56

ВВЕДЕНИЕ

В условиях пандемии Covid-19 одной из ключевых задач фармации становится поиск эффективных средств для профилактики, лечения, снижения риска осложнений тяжелой острой респираторно-вирусной инфекции и последующего восстановления организма человека после перенесенного заболевания [1–3]. В связи с этим, особое значение приобретают лекарственные растения, содержащие комплекс биологически активных веществ (БАВ) иммуномодулирующего и адаптогенного действия.

Одним из таких растений является шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis*). Подземные органы шлемника представляют ценность для создания лекарственных средств (ЛС). На сегодняшний день из разных частей шлемника выделено и идентифицировано порядка 40 соединений, в том числе флавоноиды, терпеноиды, летучие масла и полисахариды [4–6]. Экстракты на основе корней растения проявляют широкий спектр фармакологической активности, включая действие на нервную и иммунную систему, обладают выраженным противоопухолевым, антибактериальным, противовирусным и антиоксидантным эффектом [4, 8–10]. Исследования корейских ученых показали противовирусную активность скутелларина, выделенного из корней шлемника. В условиях *in vitro* этот флавон оказывает ингибирующее действие на фермент хеликазу, который отвечает за нормальное протекание клеточных процессов с участием молекул РНК и ДНК при развитии вируса SARS-CoV-2 [11, 12].

В поисках эффективного ЛС для лечения вирусных заболеваний в последние годы резко увеличился спрос на *S. baicalensis*. Неправильный сбор сырья, а также чрезмерная эксплуатация растения в естест-

венной среде обитания приводят к постепенному сокращению диких популяций шлемника [13].

Увеличение степени использования растительных ресурсов ставит под угрозу биоразнообразие флоры. Влияние антропогенного фактора, а также глобальное изменение климата сказывается на сокращении численности видов растений. Восстановление генофонда исчезающих биоресурсов традиционными методами *ex situ* длительно, трудоемко и экономически не целесообразно. Поэтому на сегодняшний день востребованным направлением становится создание культур растительных клеток. Культура *in vitro* – платформа для сохранения редких и исчезающих видов, не зависимая от внешних факторов: географических условий, климата и сезонных изменений. Культивирование клеток позволяет решать задачи генетики и селекции растительных клеток, получения ценных биологически активных веществ (БАВ) и создания технологии фитопрепаратов без нанесения вреда растениям в естественной среде обитания.

Обобщая вышеперечисленное, можно говорить о перспективности введения в культуру *in vitro* шлемника байкальского.

Однако, культивирование растительных клеток сопряжено с рядом рисков. По источнику возникновения риски классифицируются на эндогенные и экзогенные. К эндогенным (внешним) рискам относится контаминация культуры микроорганизмами, физические и химические факторы: показатель pH, состав питательной среды, тип сосуда для культивирования, аэрация, скорость перемешивания (для суспензионных культур), действия оператора и пр. Экзогенные риски связаны с процессами, протекающими «внутри» клеток, например, случайная фенотипическая или генотипическая изменчивость.

Вероятность возникновения риска может стать причиной дальнейших потерь: количества и качества продукта на выходе. Для предотвращения нежелательных последствий внедряются средства интеллектуального моделирования и системы автоматизации процесса на лабораторном уровне [14]. Такой прогрессивный подход становится тенденцией при планировании эксперимента, гарантируя стабильное, воспроизводимое и безопасное протекание культивирования растительных клеток, тем самым давая возможность повысить качество результатов исследований.

Получение эффективной платформы для синтеза вторичных метаболитов является приоритетной задачей в области фармации [15]. Для переноса технологии лабораторного культивирования на автоматизированные платформы целесообразно выявлять и оценивать риски в контексте протекающего процесса. Риск-ориентированный подход даёт возможность сформировать концепцию качества получаемой клеточной биомассы и предотвратить потери ресурсов.

Цель. Анализ рисков, возникающих при получении суспензионной культуры клеток шлемника байкальского в лабораторных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Объектом исследования служили суспензионные культуры *Scutellaria baicalensis*, выращиваемые в условиях *in vitro*. Для получения суспензионной культуры использовали рыхлые каллусы *S. baicalensis*, предоставленные лабораторией культур растительных клеток кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета.

Калий азотнокислый (CAS № 7757-79-1, АО «ВЕКТОН», Россия), аммоний азотнокислый (CAS № 6484-52-2, АО «ВЕКТОН», Россия), калий фосфорнокислый 1-замещенный (CAS № 7778-77-0, АО «ВЕКТОН», Россия), магний сернокислый, 7-водный (CAS № 10034-99-8, АО «ВЕКТОН», Россия), кальций хлористый, 2-водный (CAS № 10035-04-8, АО «ВЕКТОН», Россия), натрий молибденовокислый, 2-водный (CAS № 10102-40-6, АО «ВЕКТОН», Россия), медь сернокислая(II), 5-водная (CAS № 7758-99-8, АО «ВЕКТОН», Россия), борная кислота (CAS № 10043-35-3, АО «ВЕКТОН», Россия), марганец сернокислый(II), 5-водный (CAS № 15244-36-7, АО «ВЕКТОН», Россия), цинк сернокислый, 7-водный (CAS № 7446-20-0, АО «ВЕКТОН», Россия), калий иодистый (CAS № 7681-11-0, АО «ВЕКТОН», Россия), кобальт хлористый без никеля(II), 6-водный (АО «ВЕКТОН», Россия), железо сернокислое(II), безводное (АО «ВЕКТОН», Россия), трилон Б (CAS № 6381-92-6, АО «ВЕКТОН», Россия), тиамин гидрохлорид (CAS № 67-03-8, Merck KGaA, Германия), пиридоксин (CAS № 65-23-6, Merck KGaA, Германия), никотиновая кислота (CAS № 59-67-6, АО «ВЕКТОН», Россия), мезо-инозит (CAS № 87-89-8, Merck KGaA, Германия), сахароза (CAS № 57-50-1, АО «ВЕКТОН», Россия), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (CAS № 94-75-7, Merck KGaA, Германия), кинетин (CAS № 525-79-1, Merck KGaA, Германия), Эванс голубой (CAS № 314-13-6, ООО «Диаэм», Россия), нейтральный красный (CAS № 553-24-2, АО «ВЕКТОН», Россия).

МЕТОДЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Получение и культивирование суспензионной культуры шлемника байкальского

Пересадка рыхлого каллуса с твердой агаризированной среды осуществлялась в условиях ламинарного бокса «Ламинар-С»-1,2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) с соблюдением асептических условий. Культивирование проводили на жидкой питательной среде. Состав среды по прописи Мурасиге – Скуга (МС) приведен в таблице 1. Показатель pH контроли-

ровали с помощью pH-метра PB-11-P11 (Sartorius, Германия), который до автоклавирования поддерживался в диапазоне 5,6–5.8.

Таблица 1. Среда МС для культур растительных клеток [16]

Table 1. Medium MS for plant cell cultures [16]

№ п/п item no.	Компоненты Ingredients	Содержание Content
1	Сахароза Sucrose	30 г/л 30 g/l
2	Мезо-инозид Meso-Inositol	100 мг/л 100 mg/l
3	Кинетин Kinetin	0,5 мг/л 0.5 mg/l
4	2,4 – дихлорфеноксиуксусная кислота 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid	1 мг/л 1 mg/l
5	Маточный раствор макросолей Concentrated solution of macrosalts	50 мг/л 50 mg/l
6	Маточный раствор микросолей Concentrated solution of microsalts	1 мг/л 1 mg/l
7	Тиамина гидрохлорид Thiamine hydrochloride	1 мг/л 1 mg/l
8	Глицин Glycine	2 мг/л 2 mg/l
9	Хелат железа Ferrous chelate	5 мг/л 5 mg/l
10	Пиридоксина гидрохлорид Pyridoxine hydrochloride	0,5 мг/л 0.5 mg/l
11	Никотиновая кислота Nicotinic acid	0,5 мг/л 0.5 mg/l

Стерилизацию питательной среды осуществляли в стерилизаторе паровом СПВА-75-1-НН (ЗАО «Транс-Сигнал», Россия) при температуре 120 ± 1 °С в течение 15 минут.

Выращивание суспензионной культуры проводили в плоскодонных конических колбах Эрленмейера на 250 мл, закупоренных двойным слоем фольги, в условиях постоянного перемешивания при помощи шейкера лабораторного ПЭ-6410 (ООО «ПКФ ЭКОХИМ», Россия) при скорости вращения 100 об/мин. Цикл субкультивирования составлял 21 сутки в темноте при температуре 27–28 °С и относительной влажности 60–70 %.

Определение жизнеспособности и степени агрегированности клеток суспензионной культуры [17]

Жизнеспособность культур клеток определяли, используя прижизненные красители 0,1%-й нейтральный красный (НК) и 0,025%-й раствор Эванса голубого (ЭГ), путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом поляризационным «Биомед-5П» (ООО «Биомед», Россия). Жизнеспособность культуры выражали как процент живых культивируемых единиц к общему числу просчитанных агрегатов (не менее 200). Подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева.

Оценка рисков

Оценку рисков процесса проводили с помощью диаграммы причинно-следственных связей (диаграммы Исикавы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование *in vitro* предполагает пересадку рыхлого каллуса на жидкую питательную среду и анализ свойств биомассы в течение цикла субкультивирования (рисунок 1). На основании полученных результатов подобраны условия процесса, которые способствуют улучшению выживаемости и продуктивности клеток. Задача оптимизации в конечном итоге сводится к получению однородной, воспроизводимой и стабильной суспензии клеток.

Первым этапом исследования стало изучение физиологических параметров суспензионной культуры *S. baicalensis*: размеров клеток и степени агрегированности.

Установлено, что для клеток шлемника в суспензионных культурах характерна вытянутая овальная форма. Первичные суспензии характеризовались наличием клеток преимущественно прозенхимного типа (70 ± 2,0 %). В последующих циклах субкультивирования наблюдалось уменьшения числа прозенхимных клеток и увеличение количества одиночных паренхимных клеток с крупными ядрами и слабо выраженной вакуолизацией (рисунок 2).

Размер клеток достигал 35–40 мм (61 %). Также встречались крупные вытянутые клетки размером до 100 мм (10 %).

Для первичных суспензий характерна крупная агрегированность (рисунок 3). Диаметр агрегатов достигал порядка 8–15 мм. В ходе последующих пассажей агрегированность сохранялась. Размер клеточных скоплений уменьшился (не превышал 5 мм), наблюдалось появление одиночных клеток.

Отмечена зависимость ростовых свойств суспензии шлемника байкальского от плотности вносимого инокулята. При уменьшении количества пересаживаемой биомассы клетки в агрегатах и в одиночном состоянии проявляли склонность к деструкции (рисунок 4).

Полученные результаты показали необходимость анализа рисков лабораторной технологии суспензионного культивирования шлемника байкальского.

Риски $R(t)$ зависят от комплекса факторов. Вероятность отклонения от «нормы» может быть приемлемой и неприемлемой (критической). С целью раз-

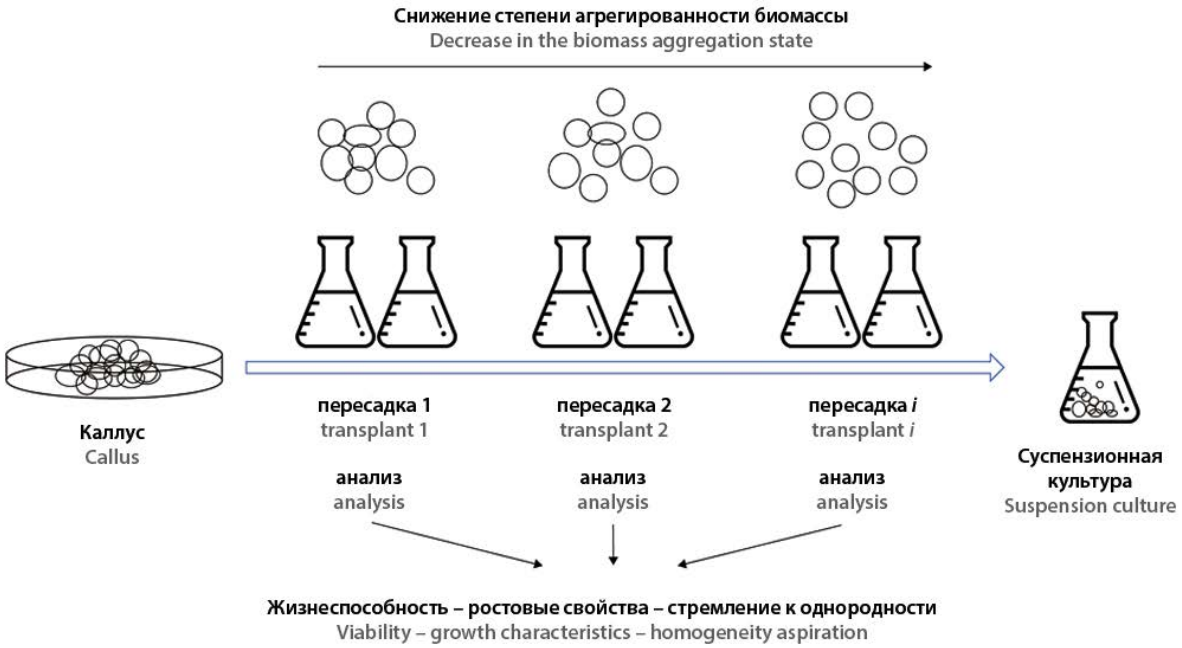


Рисунок 1. **Схема получения суспензионной культуры *in vitro***

Figure 1. **Schematic of obtaining *in vitro* suspension cultures**

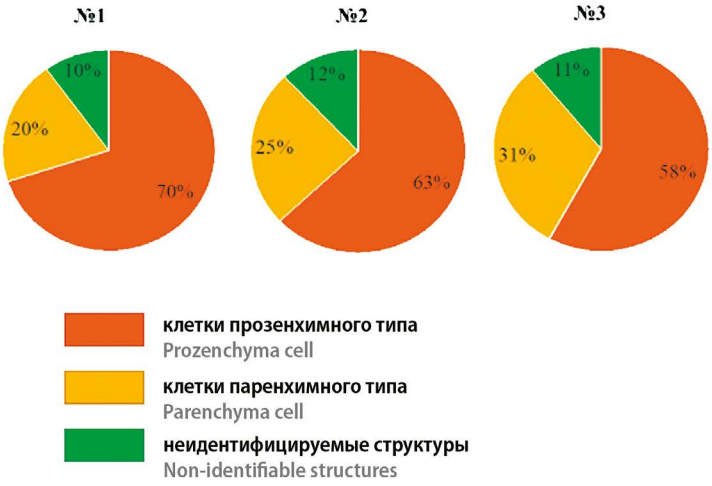


Рисунок 2. **Динамика изменения типа клеток в суспензии шлемника байкальского в пассажах № 1, № 2, № 3**

Figure 2. **Dynamics of cell type changes in Baikal skullcap suspension at passages No. 1, No. 2, No. 3**

граничения категорий рисков вводится показатель допустимого уровня риска [$R(t)$]. Развитие рисков во времени можно охарактеризовать как некую функцию R от времени, которая изменяется определенным образом в пределах допустимого уровня (ПДУ) по мере протекания процесса [18]. Карта развития риска представлена на рисунке 5.

Приемлемой моделью развития риска является участок функции в диапазоне (t_0; [t]). Если функция выходит за пределы участка «1» (зеленого квадранта), последствия риска становятся опасными или критическими для процесса. Следовательно, возникает необходимость минимизации вероятности внешних воздействий на объект (модель – суспензионную культуру).

Для решения задач по снижению вероятных рисков до уровня приемлемых необходим структурный анализ защищенности объекта от эндогенных и экзогенных воздействий. Алгоритм оценки защищенности суспензионной культуры шлемника реализуется посредством контроля «критических» точек процесса. Можно выделить пять наиболее значимых факто-

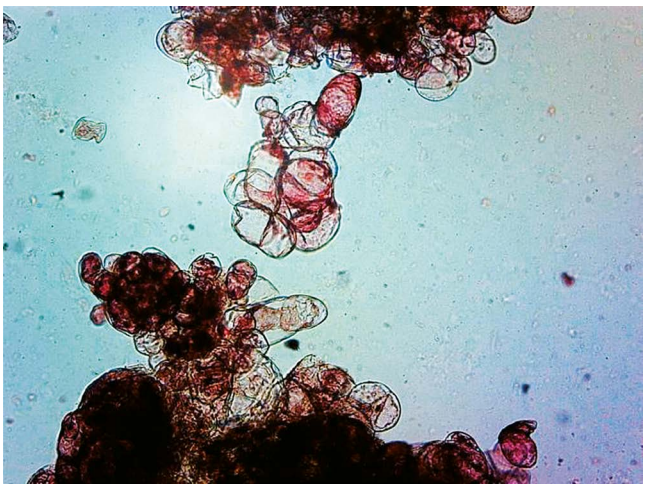


Рисунок 3. **Агрегаты в суспензии шлемника байкальского**

Figure 3. **Aggregates in a Baikal skullcap suspension**

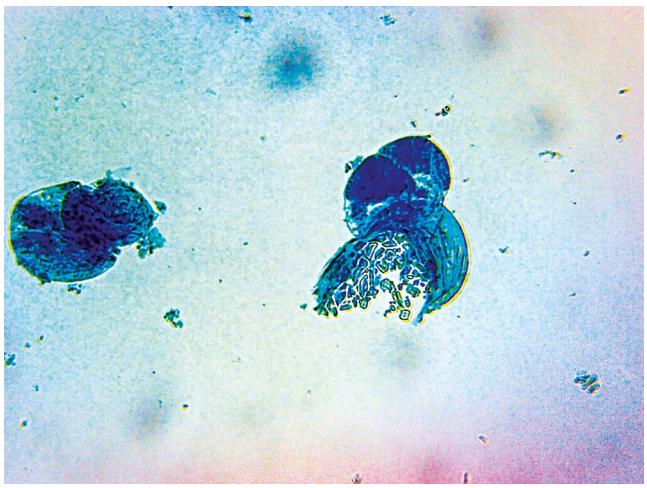


Рисунок 4. **Деструкция клеток в суспензионной культуре шлемника байкальского**

Figure 4. **Cell Destruction in a Baikal Skullcap Suspension Culture**

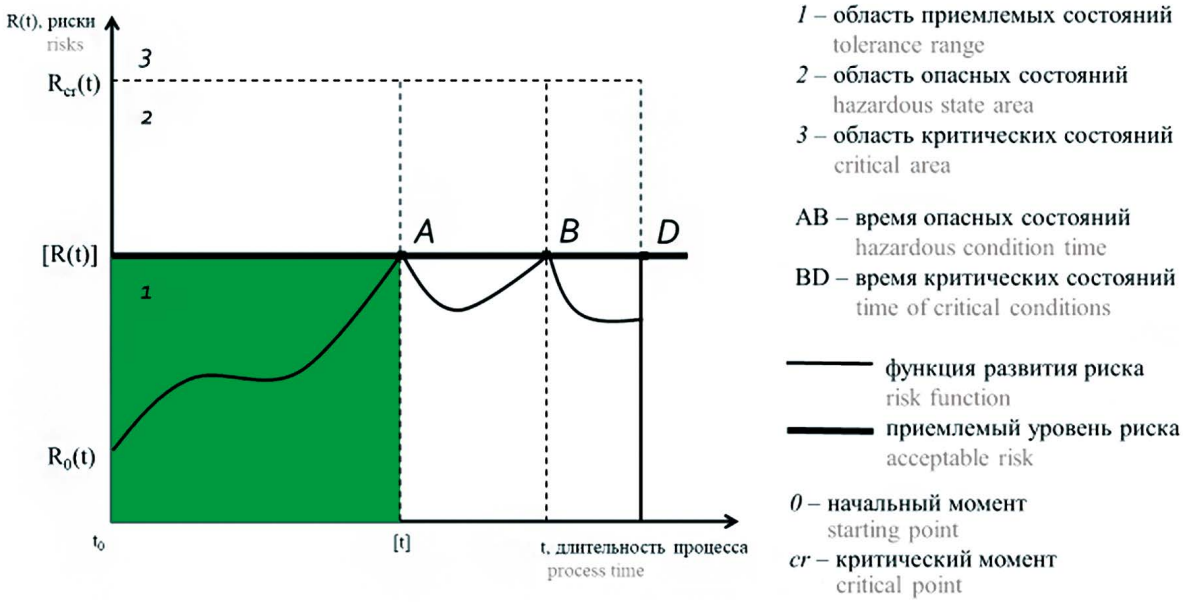


Рисунок 5. **Карта развития риска**

Figure 5. **Risk profile**

ров при лабораторном культивировании растительных клеток: качество исходного сырья (каллуса), качество приготовленной жидкой питательной среды, исправность и пригодность оборудования (колб с укупорочными средствами, автоклава, шейкера), действия оператора и пригодность технологии получения клеточных культур и отбора проб для анализа показателей жизнеспособности биомассы. Анализ рисков можно представить в виде диаграммы Исикавы (рисунок 6).

Существенное влияние на технологический процесс оказывает человеческий фактор. Его воздействие наблюдается в непосредственных действиях оператора, выполняющего рутинные работы, а также на этапе приготовления субстрата, внедрения и реализации технологии. Вероятность перехода риска за пределы ПДУ достаточно велика. Чтобы нивелировать влияние потенциального источника контаминации продукта (снизить вероятность риска), часть процедур благодаря современным технологиям можно перевести на автоматизированный уровень. Достоинствами подхода становятся возможности проведения процедуры с заданной частотой и периодичностью и обеспечении требуемых характеристик культуры растительных клеток.

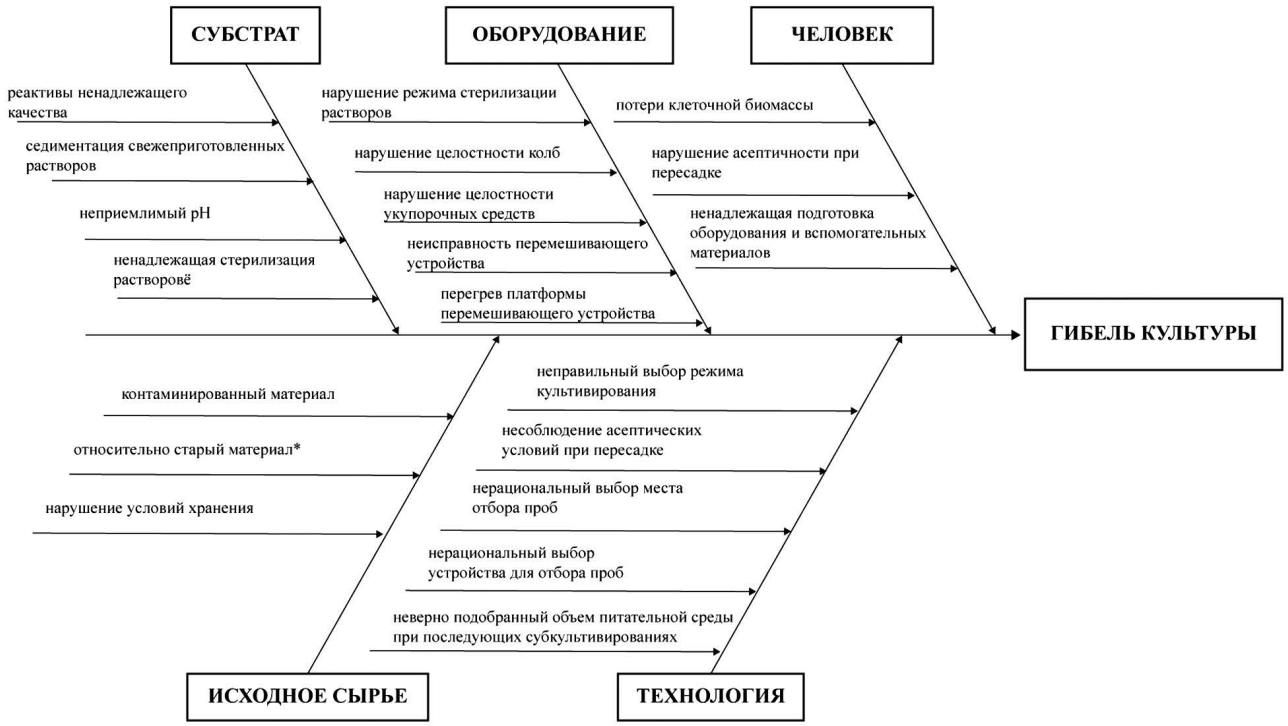


Рисунок 6. Диаграмма причинно-следственных связей для оценки рисков гибели суспензионной культуры шлемника байкальского

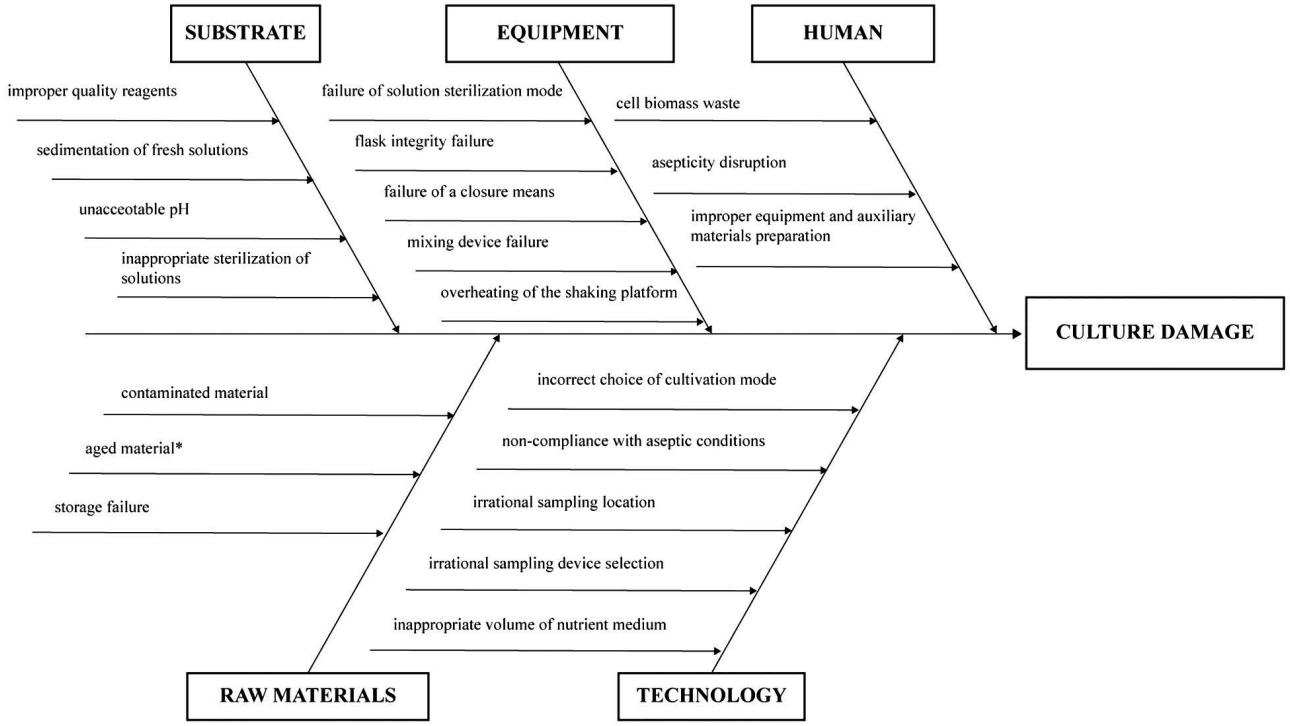


Figure 6. Cause-effect diagram for risk assessment for Baical skullcap suspension culture mortality

Внедрение мер, обеспечивающих защищенность культуры от действия внешних факторов, является основной принятия решений при риск-ориентированном подходе. За модель принимается суспензионная культура.

Можно предложить следующий алгоритм анализа защищенности модели (рисунок 7).

Характеристиками объекта являются размеры и форма клеток, наличие агрегатов и их габариты, а также состав питательной среды. В качестве возможных условий экспозиции культуры рассматриваются внешние регламентированные (выбор режима культивирования: аэрация, перемешивание, напряжение сдвига, температура, влажность, освещенность) и внешние нерегламентированные (внесение патогенных микроорганизмов). Восприимчивость культуры к воздействиям оценивается следующими нежелательными последствиями: деградацией ростовых свойств клеток, высокой степенью агрегированности, повреждением клеточных стенок или контаминацией. На основании данной оценки делаются выводы о вероятности возникновения нежелательных последствий, после чего формулируется комплекс предупреждающих мер – конечная цель анализа защищенности культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, благодаря риск-ориентированному подходу появляется возможность предотвращения снижения качества продукта путем контроля критических точек процесса. Принцип анализа и оценки рисков становится одним из ключевых направлений. Предложенный алгоритм анализа состояния суспензий способствует обеспечению безопасности и защищенности модели. Инструментарий риск-менеджмента создает основу для модернизации существующей технологии и автоматического оснащения процесса. Данная тенденция становится перспективной для формирования платформы культур клеток редких и исчезающих видов растений, что в конечном счете отвечает направлению сохранения и поддержания природных ресурсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудима Г. О., Хаитов Р. М., Кудлай Д. А., Хаитов М. Р. Молекулярно-иммунологические аспекты диагностики, профилактики и лечения коронавирусной инфекции. *Иммунология*. 2021;42(3):198–210. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-198-210.

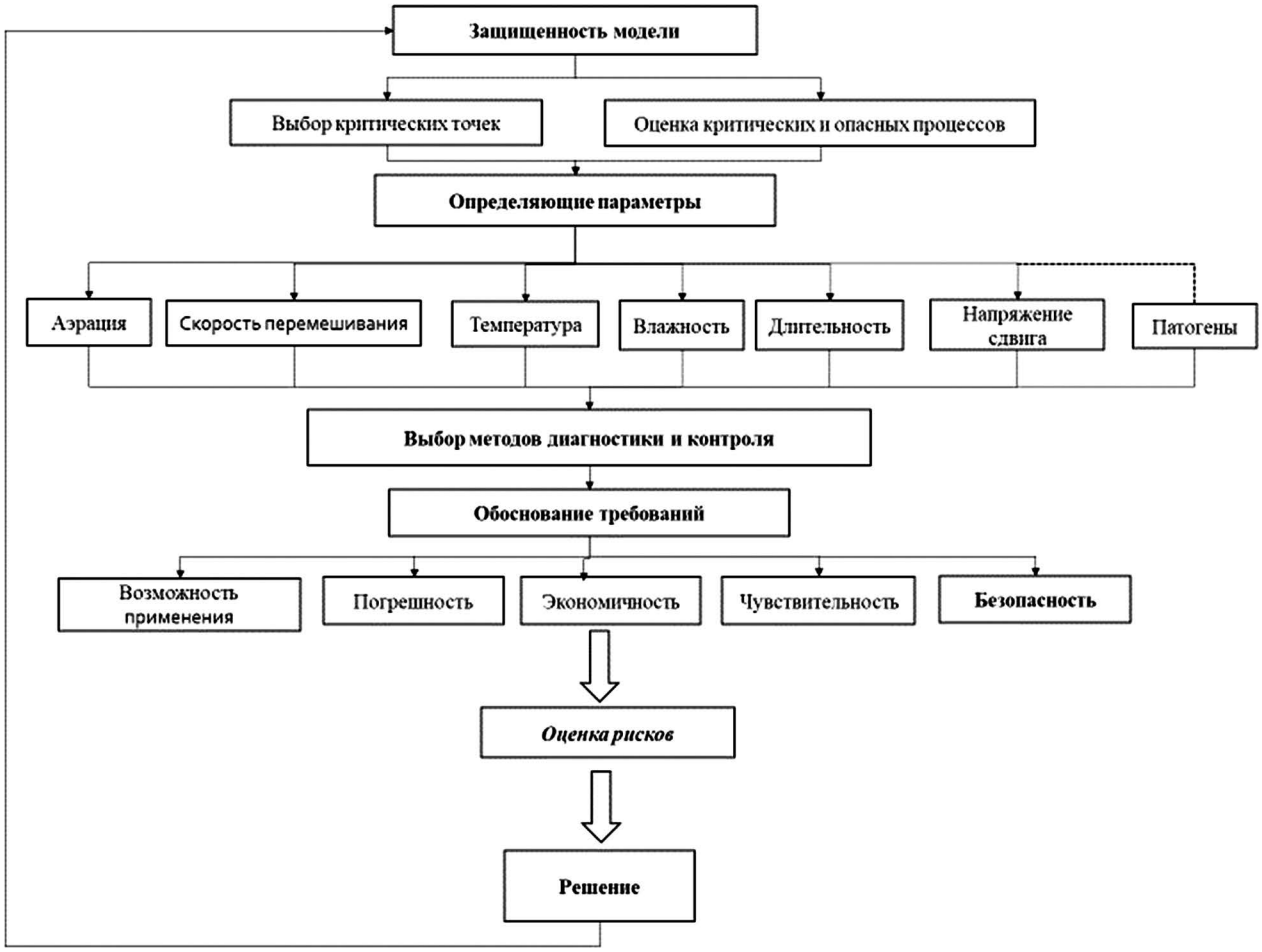


Рисунок 7. Алгоритм анализа защищенности суспензионной культуры шлемника байкальского

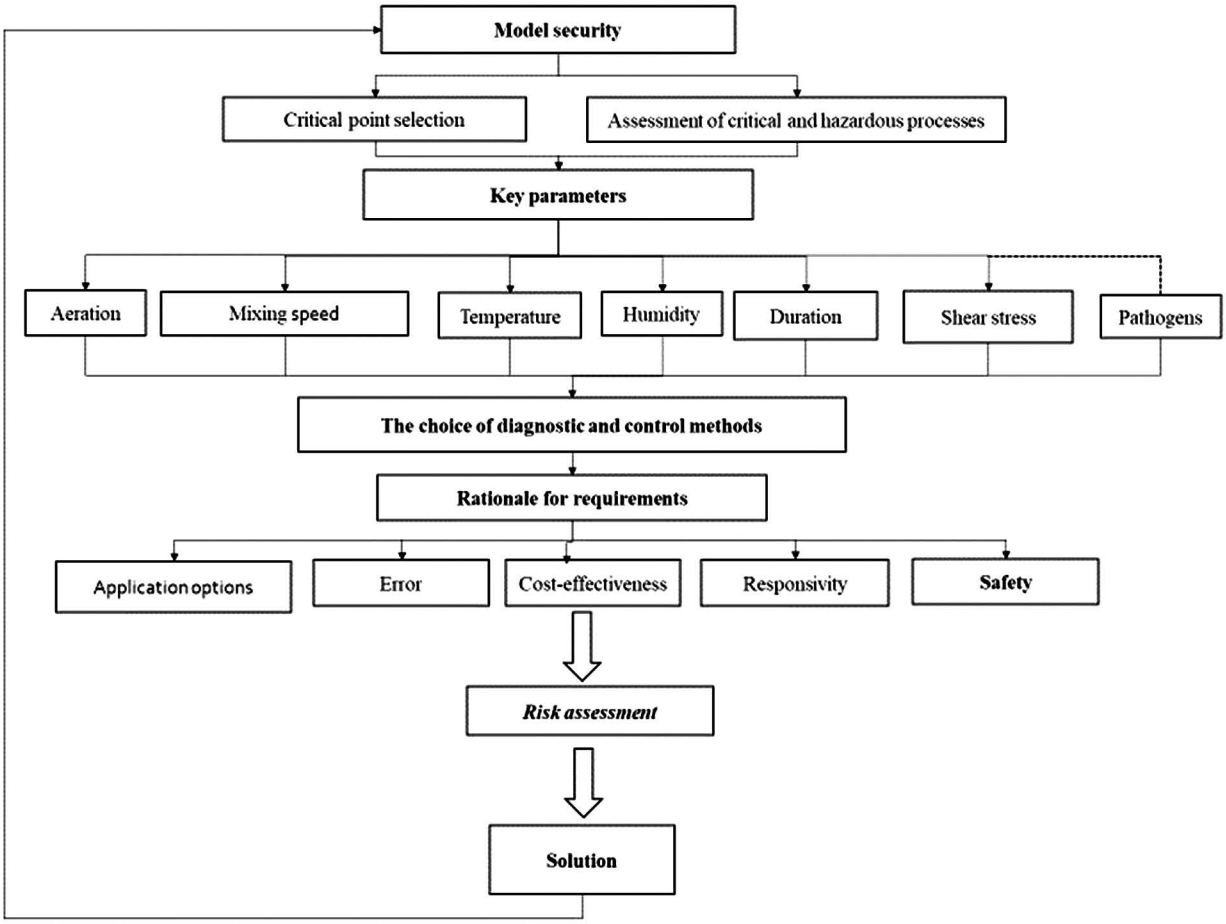


Figure 7. Algorithm of baikal skullcap suspension culture security analysis

2. Jiang S., Du L., Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):275–277. DOI: 10.1080/22221751.2020.1723441.
3. Смолянова Т. И., Багаева Н. С., Колганова М. А., Шохин И. Е., Николаева А. М., Вязникова Т. В., Панкратова А. А., Быкова Е. А. Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):180–186. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186.
4. Zhao T., Tang H., Xie L., Zheng Y., Ma Z., Sun Q., Li X. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(9):1353–1369. DOI: 10.1111/jphp.13129.
5. Yan B., Xu W., Su S., Zhu S., Zhu Z., Zeng H., Zhao M., Qian D., Duan J. A., Duan J. Comparative analysis of 15 chemical constituents in Scutellaria baicalensis stem-leaf from different regions in China by ultra-high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2017;40:3570–3581.
6. Zhao Q., Yang J., Cui M. Y. The reference genome sequence of Scutellaria baicalensis provides insights into the evolution of Wogonin biosynthesis. *Molecular Plant*. 2019;12:935–950.
7. Wang Z.-L., Wang S., Kuang Y. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of Scutellaria baicalensis. *Pharmaceutical Biology*. 2018;56(1):465–484. DOI: 10.1080/13880209.2018.1492620.
8. Dinda B., Dinda S., Dassharma S., Banik R., Chakraborty A., Dinda M. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;131:68–80. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.004.
9. Hassanin M., Tolba M., Tadros M. Wogonin a Promising Component of Scutellaria baicalensis: A Review on its Chemistry, Pharmacokinetics and Biological Activities. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*. 2019;3(2):170–179, DOI: 10.21608/aps.2019.18854.1016.
10. Кунакова Р. В., Зайнуллин Р. А. Природные соединения растительного происхождения в борьбе с коронавирусом. *Вестник Академии наук Республики Башкортостан*. 2020;2(98):87–92. DOI: 10.24411/1728-5283-2020-10210.
11. Lawson S. K., Satyal P., Setzer W. N. Phytochemical Analysis of the Essential Oils From Aerial Parts of Four Scutellaria "Skullcap" Species Cultivated in South Alabama: *Scutellaria baicalensis* Georgi, *S. Barbata* D. Don, *S. Incana* Biehler, and *S. Lateriflora* L. *Natural Product Communications*. 2021;16(8):1934578X2110259. DOI: 10.1177/1934578X211025930.
12. Song J.-W., Long J.-Y., Xie L., Zhang L.-L., Xie Q.-X., Chen H.-J., Deng M., Li X.-F. Applications, phytochemistry, pharmacological effects, pharmacokinetics, toxicity of Scutellaria baicalensis Georgi. and its probably potential therapeutic effects on COVID-19: a review. *Chinese Medicine*. 2020;15(1):102. DOI: 10.1186/s13020-020-00384-0.
13. Xu N., Meng F., Zhou G., Li Yu., Wang B., Lu H. Assessing the suitable cultivation areas for Scutellaria baicalensis in China using the Maxent model and multiple linear regression. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2020;90:104052. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104052.

14. Иващук О. А., Щербинина Н. В., Забнин С. А. Нейросетевой подход при автоматизации подбора питательной среды для выращивания растений в условиях *in vitro*. *Современные наукоемкие технологии*. 2019;7:30–34. .
15. Дзержинская А. А., Спиридонова А. А., Хомутова Е. Г. Системный подход к управлению рисками перекрестной контаминации при производстве лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):149–158. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-149-158.
16. Titova M. V., Popova E. V., Konstantinova S. V., Kochkin D. V., Ivanov I. M., Klyushin A. G., Titova E. G., Nebera E. A., Vasilevskaya E. R., Tolmacheva G. S., Kotenkova E. A., Nosov A. M., Paek K.-Y. Suspension Cell Culture of Dioscorea deltoidea—A Renewable Source of Biomass and Furostanol Glycosides for Food and Pharmaceutical Industry. *Agronomy*. 2021;11(2):394. DOI: 10.3390/agronomy11020394.
17. Glagoleva E. S., Konstantinova S. V., Kochkin D. V., Ossipov V., Titova M. V., Popova E. V., Nosov A. M., Paek K.-Y. Predominance of oleanane-type ginsenoside R0 and malonyl esters of protopanaxadiol-type ginsenosides in the 20-year-old suspension cell culture of Panax japonicus C.A. Meyer. *Industrial Crops and Products*. 2022;177:114417. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114417.
18. Махутов Н. А., Гаденин М. М., Юдина О. Н. Научный анализ рисков в жизнеобеспечении человека, общества и государства. *Проблемы анализа риска*. 2019;16(2):70–86. DOI: 10.32686/1812-5220-2019-16-2-70-86.

REFERENCES

1. Gudima G. O., Khaitov R. M. , Kudlay D. A., Khaitov M. R. Molecular and immunological aspects of diagnosis, prevention, and treatment of coronavirus infection. *Immunologiya*. 2021;42(3):198–210. (In Russ.) DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-198-210
2. Jiang S., Du L., Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):275–277. DOI: 10.1080/22221751.2020.1723441.
3. Smolyanova T. I., Bagaeva N. S., Kolganova M. A., Shohin I. E., Nikolaeva A. M., Vyaznikova T. V., Pankratova A. A., Bykova E. A. Phase I Pharmacokinetics Study of Drug «COVID-globulin» (Specific Human Immunoglobulin Against COVID-19). *Drug development & registration*. 2022;11(2):180–186. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186.
4. Zhao T., Tang H., Xie L., Zheng Y., Ma Z., Sun Q., Li X. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(9):1353–1369. DOI: 10.1111/jphp.13129.
5. Yan B., Xu W., Su S., Zhu S., Zhu Z., Zeng H., Zhao M., Qian D., Duan J. A., Duan J. Comparative analysis of 15 chemical constituents in Scutellaria baicalensis stem-leaf from different regions in China by ultra-high performance liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2017;40:3570–3581.
6. Zhao Q., Yang J., Cui M. Y. The reference genome sequence of Scutellaria baicalensis provides insights into the evolution of Wogonin biosynthesis. *Molecular Plant*. 2019;12:935–950.
7. Wang Z.-L., Wang S., Kuang Y. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of Scutellaria baicalensis. *Pharmaceutical Biology*. 2018;56(1):465–484. DOI: 10.1080/13880209.2018.1492620.
8. Dinda B., Dinda S., Dassharma S., Banik R., Chakraborty A., Dinda M. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;131:68–80. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.004.
9. Hassanin M., Tolba M., Tadros M. Wogonin a Promising Component of Scutellaria baicalensis: A Review on its Chemistry, Pharmacokinetics and Biological Activities. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*. 2019;3(2):170–179, DOI: 10.21608/aps.2019.18854.1016.
10. Kunakova R. V., Zainullin R. A. Natural chemicals derived from plants against coronaviruses. *Bulletin of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan*. 2020;2(98):87–92. (In Russ.) DOI: 10.24411/1728-5283-2020-10210.
11. Lawson S. K., Satyal P., Setzer W. N. Phytochemical Analysis of the Essential Oils From Aerial Parts of Four Scutellaria "Skullcap" Species Cultivated in South Alabama: *Scutellaria baicalensis* Georgi, *S. Barbata* D. Don, *S. Incana* Biehler, and *S. Lateriflora* L. *Natural Product Communications*. 2021;16(8):1934578X2110259. DOI: 10.1177/1934578X211025930.
12. Song J.-W., Long J.-Y., Xie L., Zhang L.-L., Xie Q.-X., Chen H.-J., Deng M., Li X.-F. Applications, phytochemistry, pharmacological effects, pharmacokinetics, toxicity of Scutellaria baicalensis Georgi. and its probably potential therapeutic effects on COVID-19: a review. *Chinese Medicine*. 2020;15(1):102. DOI: 10.1186/s13020-020-00384-0.
13. Xu N., Meng F., Zhou G., Li Yu., Wang B., Lu H. Assessing the suitable cultivation areas for Scutellaria baicalensis in China using the Maxent model and multiple linear regression. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2020;90:104052. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104052.
14. Ivaschuk O. A., Shcherbinina N. V., Zabnin S. A. Neural network approach to automating the selection of nutrient environment for cultivation of plants under *in vitro* conditions. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. 2019;7:30–34. (In Russ.)
15. Dzerzhinskaya A. A., Spiridonova A. A., Khomutova E. G. Systematic approach to cross-contamination risk management in the production of medicinal products. *Drug development & registration*. 2022;11(1):149–158. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-149-158.
16. Titova M. V., Popova E. V., Konstantinova S. V., Kochkin D. V., Ivanov I. M., Klyushin A. G., Titova E. G., Nebera E. A., Vasilevskaya E. R., Tolmacheva G. S., Kotenkova E. A., Nosov A. M., Paek K.-Y. Suspension Cell Culture of Dioscorea deltoidea—A Renewable Source of Biomass and Furostanol Glycosides for Food and Pharmaceutical Industry. *Agronomy*. 2021;11(2):394. DOI: 10.3390/agronomy11020394.
17. Glagoleva E. S., Konstantinova S. V., Kochkin D. V., Ossipov V., Titova M. V., Popova E. V., Nosov A. M., Paek K.-Y. Predominance of oleanane-type ginsenoside R0 and malonyl esters of protopanaxadiol-type ginsenosides in the 20-year-old suspension cell culture of Panax japonicus C.A. Meyer. *Industrial Crops and Products*. 2022;177:114417. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114417.
18. Makhutov N. A., Gadenin M. M., Yudina O. N. The scientific analysis of risks in life-support of a person, a society and the state. Issues of Risk Analysis. 2019;16(2):70–86. (In Russ.) DOI: 10.32686/1812-5220-2019-16-2-70-86

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-57-63
УДК 57.084.1

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Исследование гиполипидемической активности полисахарида L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактуронана при комбинированном применении с ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы и абсорбции холестерола

Е. Е. Буйко[1,2]✉, В. В. Иванов[1], О. А. Кайдаш[1], О. Ю. Рыбалкина[3], Е. А. Киселева[3], С. В. Кривощеков[1], Т. Л. Киселева[4], А. М. Гурьев[1], М. В. Белоусов[1,2]

[1] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
[2] ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30
[3] НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3
[4] Научно-исследовательский центр НО «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов», 115230, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 36

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

ORCID: Е. Е. Буйко – https://orcid.org/0000-0002-6714-1938; В. В. Иванов –https://orcid.org/0000-0001-9348-4945; О. А. Кайдаш – https://orcid.org/0000-0001-8761-7537; О. Ю. Рыбалкина – https://orcid.org/0000-0001-8577-4520; Е. А. Киселева – https://orcid.org/0000-0001-7853-3294; С. В. Кривощеков – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141; Т. Л. Киселева – https://orcid.org/0000-0001-9894-3047; А. М. Гурьев – https://orcid.org/0000-0002-1120-4979; М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 27.06.2022 **Статья принята в печать:** 12.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Во многих случаях для терапии дислипидемий требуется тщательно подобранная комбинированная терапия гиполипидемическими лекарственными препаратами, в том числе с использованием секвестрантов желчных кислот. Перспективным соединением является L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактуронан (L-RAG) – полисахарид, получаемый из листьев березы повислой (*Betula pendula* L.).

Цель. Оценить гиполипидемическую активность L-RAG при комбинированном назначении с ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы розувастатином или ингибитором абсорбции холестерола эзетимибом.

Материалы и методы. Для моделирования гиперлипидемии у хомяков использовали синтетическую диету с добавлением 0,3 % ХС и 11 % кокосового масла (ВЖХД). По окончании эксперимента в сыворотке крови определяли содержание триацилглицеролов (ТАГ), желчных кислот, ХС, холестерола липопротеинов низкой (ХС-ЛПНП) и высокой (ХС-ЛПВП) плотностей ферментативными наборами Chronolab Systems S. L. (Испания), рассчитывали индекс атерогенности (ИА).

Результаты и обсуждение. L-RAG оказывает гиполипидемическое действие в модели диет-индуцированной гиперлипидемии у хомяков. Снижение уровня общего ХС в сыворотке крови обусловлено в большей степени уменьшением содержания ХС во фракции атерогенных ЛПНП, что приводило к уменьшению ИА. Применение розувастатина и эзетимиба в комбинации с L-RAG приводит к более выраженному гиполипидемическому эффекту. Аддитивное влияние полисахарида обусловлено, главным образом, снижением уровня желчных кислот в сыворотке крови, что свидетельствует о его способности сорбировать их в просвете кишечника и прерывать энтерогепатическую циркуляцию, действуя подобно препаратам-секвестрантам желчных кислот.

Заключение. Показано, что курсовое применение L-RAG совместно с эзетимибом или розувастатином приводило к более выраженному снижению уровней ХС, ТАГ, ХС-ЛПНП, чем при монотерапии полисахаридом или препаратами сравнения в отдельности. Полученные данные обосновывают перспективность использования L-RAG в комплексной терапии гиперлипидемии.

Ключевые слова: гиперлипидемия, полисахарид березы повислой (*Betula pendula* L.), секвестранты желчных кислот, эзетимиб, розувастатин

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

Вклад авторов. М. В. Белоусов, В. В. Иванов, А. М. Гурьев обосновали актуальность работы. А. М. Гурьев, С. В. Кривощеков выделяли и проводили стандартизацию субстанции полисахарида листьев березы повислой (*Betula pendula* L.). Е. Е. Буйко, В. В. Иванов, О. А. Кайдаш, О. Ю. Рыбалкина, Е. А. Киселева разработали эксперимент, проводили исследования с использованием биологических тест-систем и биологических образцов. Е. Е. Буйко, О. А. Кайдаш и В. В. Иванов участвовали в обработке данных и проводили теоретические расчеты. Е. Е. Буйко, В. В. Иванов, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет – 2030».

Соответствие принципам этики. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации и были одобрены биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга, протокол № 129062017 от 29 июня 2017 года.

Для цитирования: Буйко Е. Е., Иванов В. В., Кайдаш О. А., Рыбалкина О. Ю., Киселева Е. А., Кривощеков С. В., Киселева Т. Л., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Исследование гиполипидемической активности полисахарида L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактуронана при комбинированном применении с ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы и абсорбции холестерола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):57–63. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-57-63

© Буйко Е. Е., Иванов В. В., Кайдаш О. А., Рыбалкина О. Ю., Киселева Е. А., Кривощеков С. В., Киселева Т. Л., Гурьев А. М., Белоусов М. В., 2022
© Buyko E. E., Ivanov V. V., Kaidash O. A., Rybalkina O. Yu., Kiseleva E. A., Krivoshchekov S. V., Kiseleva T. L., Guriev A. M., Belousov M. V., 2022

Hypolipidemic Activity of the Polysaccharide L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galacturonan in Combined Administration with HMG-CoA Reductase and Cholesterol Absorption Inhibitors

Evgeny E. Buyko[1,2]✉, Vladimir V. Ivanov[1], Olga A. Kaidash[1], Olga Yu. Rybalkina[3], Elena A. Kiseleva[3], Sergey V. Krivoshchekov[1], Tatiana L. Kiseleva[4], Artem M. Guriev[1], Mikhail V. Belousov[1,2]

[1] Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia
[2] National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia
[3] Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMC, 3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russia
[4] Research Center of the NCO "Professional Association of Naturotherapists", 36, Varshavskoe shosse, Moscow, 115230, Russia

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

ORCID: Evgeny E. Buyko – https://orcid.org/0000-0002-6714-1938; Vladimir V. Ivanov –https://orcid.org/0000-0001-9348-4945; Olga A. Kaidash – https://orcid.org/0000-0001-8761-7537; Olga Yu. Rybalkina – https://orcid.org/0000-0001-8577-4520; Elena A. Kiseleva – https://orcid.org/0000-0001-7853-3294; Sergey V. Krivoshchekov – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141; Tatiana L. Kiseleva – https://orcid.org/0000-0001-9894-3047; Artem M. Guriev – https://orcid.org/0000-0002-1120-4979; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 27.06.2022 **Revised:** 12.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Dyslipidemia treatment in many cases requires carefully selected combination of lipid-lowering drugs including bile acid sequestrants. A promising compound is L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galacturonan (L-RAG), a polysaccharide obtained from the birch leaves (*Betula pendula* L.).

Aim. To evaluate the lipid-lowering activity of L-RAG administered in combination with the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin or the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe.

Materials and methods. Hyperlipidemia in hamsters was reproduced by synthetic diet supplemented with 0.3 % cholesterol and 11 % coconut oil (HFCD). At the end of the experiment the levels of triacylglycerols (TAG), bile acids, total cholesterol (TC), cholesterol of low-density lipoproteins (LDL-C) and high-density lipoproteins (HDL-C) were determined in the blood serum using Chronolab Systems S. L. enzymatic kits (Spain), and atherogenic index (AI) was calculated.

Results and discussion. L-RAG demonstrates a lipid-lowering effect in a model of diet-induced hyperlipidemia in hamsters. The decrease in the TC level was mainly caused by a decrease in the content of cholesterol in the atherogenic LDL fraction, which led to a decrease in AI. The use of rosuvastatin and ezetimibe in combination with L-RAG leads to a better lipid-lowering effect. The additive effect of the polysaccharide is mainly due to a decrease in the level of bile acids in the blood serum, which indicates its ability to absorb them in the intestinal lumen and interrupt enterohepatic circulation, acting like bile acid sequestrants.

Conclusion. It was shown that administration of L-RAG together with ezetimibe or rosuvastatin led to a better decrease in the TC, TAG, LDL-C levels than with polysaccharide monotherapy or comparison drugs alone. The obtained data substantiate the prospects of using L-RAG in the complex therapy of hyperlipidemia.

Keywords: hyperlipidemia, birch polysaccharide (*Betula pendula* L.), bile acid sequestrants, ezetimibe, rosuvastatin

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. Mikhail V. Belousov, Vladimir V. Ivanov, Artem M. Guriev substantiated the relevance of the work. Artem M. Guriev, Sergey V. Krivoshchekov isolated and standardized the substance of the birch polysaccharide. Evgeny E. Buyko, Vladimir V. Ivanov, Olga A. Kaidash, Olga Yu. Rybalkina, Elena A. Kiseleva developed an experiment, conducted research using biological test systems and biological samples. Evgeny E. Buyko, Olga A. Kaidash and Vladimir V. Ivanov participated in data processing and carried out theoretical calculations. Evgeny E. Buyko, Vladimir V. Ivanov, Mikhail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The study was carried out as part of the Strategic Academic Leadership Program "Priority 2030".

Compliance with the principles of ethics. Experiments with the use of laboratory animals were carried out in compliance with the principles of humanity set forth in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki and were approved by the bioethical committee of the of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, protocol No. 129062017 dated June 29, 2017.

For citation: Buyko E. E., Ivanov V. V., Kaidash O. A., Rybalkina O. Yu., Kiseleva E. A., Krivoshchekov S. V., Kiseleva T. L., Guriev A. M., Belousov M. V. Hypolipidemic activity of the polysaccharide L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galacturonan in combined administration with HMG-CoA reductase and cholesterol absorption inhibitors. *Drug development & registration*. 2022;11(3):57–63. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-57-63

ВВЕДЕНИЕ

Дислипидемия – патологическое состояние, при котором наблюдается широкий спектр нарушений обмена фракций холестерола липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) и холестерола липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), что выражается в изменении их соотношения в крови пациентов [1]. Нарушение баланса в содержании ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП, характеризующееся в первую очередь, повышением уровня ХС-ЛПНП (гиперлипидемия), приводит к возрастанию риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), включая инфаркт миокарда и инсульт [2]. У пациентов с генетически опосредованной семейной ги-

перлипидемией трудно достичь целевых значений ХС-ЛПНП, они имеют риск развития ССЗ в более раннем возрасте, и в таких случаях требуется тщательно подобранная комбинированная терапия гиполипидемическими лекарственными препаратами, в том числе с секвестрантами желчных кислот [3].

В последние десятилетия пристальное внимание привлекает возможность использовать для терапии дислипидемий растительные полисахариды, которые в экспериментах продемонстрировали наличие гипохолестеролемического и гиполипидемического действий [4]. Было показано, что полисахариды растительного происхождения обладают гиполипидемической активностью, действуя подобно препаратам-секвестрантам желчных кислот, то есть снижают уровень ХС-ЛПНП за счет уменьшения всасывания желчных кислот в кишечнике, что стимулирует их синтез из ХС и снижает содержание ХС в сыворотке крови пациентов [5].

С использованием комплексной методики экстракции/очистки была выделена субстанция полисахарида листьев березы повислой (*Betula pendula* L.) L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактуронана (L-RAG) [6]. Полисахарид был охарактеризован и в экспериментах продемонстрировал наличие у него гиполипидемической активности, реализуемой по механизму, сходному с действием секвестрантов желчных кислот [7–8].

Целью исследования была оценка гиполипидемической активности комбинации полисахарида листьев березы повислой (*Betula pendula* L.) L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактуронана с ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы розувастатином или ингибитором абсорбции холестерола эзетимибом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 56 сирийских хомяках самцах SPF-категории, полученных из центра коллективного пользования «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Животные находились в стандартных условиях содержания в виварии.

Интактные хомяки получали синтетическую диету, разработанную Американским институтом питания (American Institute of Nutrition, AIN) для грызунов AIN-93G в течение 5 недель ($n = 8$). Для моделирования хронической гиперлипидемии у хомяков использовалась синтетическая диета AIN-93G с добавлением 0,3 % ХС и 11 % кокосового масла (высокожировая диета, богатая ХС, ВЖХД) в течение 3 недель. В последующие 2 недели в синтетическую ВЖХД добавляли L-RAG в дозе 3 г / 100 г корма, поскольку лекарственные средства группы секвестрантов у пациентов принимаются с пищей. Эзетимиб и розувастатин вводили животным ежедневно внутрижелудочно в дозах 2 мг/кг ($n = 8$) и 1 мг/кг ($n = 8$) соответственно в течение 4–5 недель содержания животных ВЖХД. Хомяки контрольной группы ($n = 8$) находились на ВЖХД в течение 5 недель.

Через 5 недель животных всех групп подвергали эвтаназии, и в сыворотке крови определяли содержание триацилглицеролов (ТАГ), желчных кислот, ХС, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПВП ферментативными наборами Chronolab Systems S. L. (Испания). Для интегральной характеристики липидного спектра плазмы крови и оценке риска развития атеросклероза информативным показателем является индекс атерогенности (ИА), отражающий отношение содержания ХС в атерогенных липопротеинах к антиатерогенным. ИА рассчитывали по формуле:

$$ИА = (общий\ ХС – ХС – ЛПВП)/ХС – ЛПВП$$ [9].

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel (2007) и STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Проверку на нормальность распределения значений проверяли с использованием критерия Шапиро – Уилка. Поскольку распределение значений отличалось от нормального, анализ статистической значимости различий между выборками выполняли при помощи критерий Краскела – Уоллиса, статистически значимым считали результат при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1–Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сыворотке крови животных, получавших в течение 5 недель ВЖХД, содержание ХС и ТАГ увеличивалось в 2,6 ($p < 0,01$) и 3,4 раза ($p < 0,01$) соответственно, по сравнению с таковыми значениями в группе хомяков, получавших синтетическую диету AIN-93G, что свидетельствует о развитии хронической гиперлипидемии (рисунки 1, А и 1, Б). Увеличение содержания ХС и ТАГ на фоне ВЖХД обусловлено повышенным содержанием в диете растительных жиров (15 % калорийности) и наличия в корме 0,3 г / 100 г корма ХС [10].

Применение L-RAG в дозе 3 г/100г корма на фоне ВЖХД в течение 2 недель приводило к снижению в сыворотке крови хомяков содержания ХС на 16,2 % ($p < 0,05$) и ТАГ на 27,6 % ($p < 0,05$). При монотерапии блокатором всасывания ХС в кишечнике эзетимибом (2 мг/кг ежедневно в течение 2 недель) на фоне ВЖХД регистрировалось снижение уровня ХС и ТАГ на 41,6 % ($p < 0,01$) и 27,4 % ($p < 0,05$). Совместное применение L-RAG и эзетимиба приводило к более выраженному гиполипидемическому действию по сравнению с монотерапией. Так, при комбинированной терапии L-RAG и эзетимибом отмечалось снижение содержания в сыворотке крови хомяков ХС (49,5 %, $p < 0,01$) и ТАГ (44,0 %, $p < 0,01$) на фоне ВЖХД (рисунки 1, А и 1, Б).

Ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы розувастатин (1 мг/кг ежедневно в течение 2 недель) на фоне ВЖХД не оказывал существенного влияния на уровень ТАГ в сыворотке крови хомяков, но снижал со-

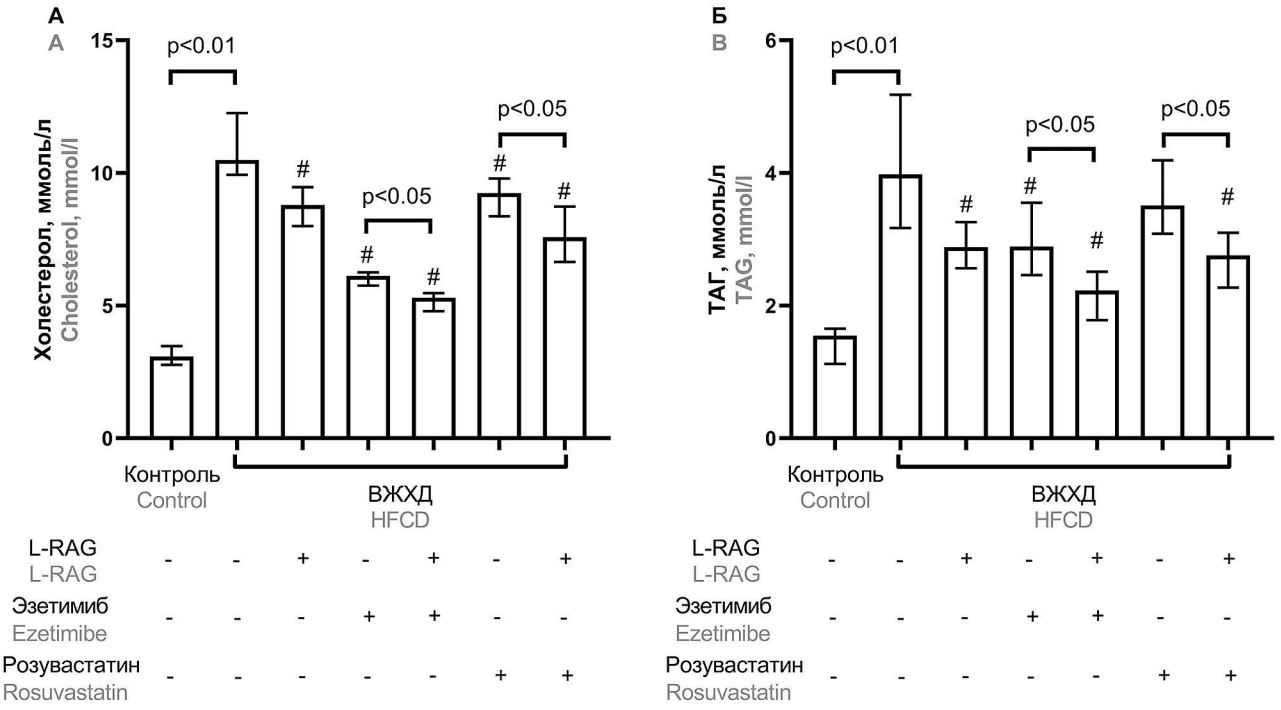


Рисунок 1. Влияние L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактоурана (L-RAG), эзетимиба, розувастатина на содержание общего холестерола (А) и триацилглицеролов (ТАГ) (Б) в сыворотке крови хомяков с хронической гиперлипидемией, вызванной высокожировой диетой, богатой холестеролом (ВЖХД). # – различия по сравнению с группой животных, получавших ВЖХД, статистически значимы

Figure 1. The effect of L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galactouran (L-RAG), ezetimibe, rosuvastatin on the content of total cholesterol (A) and triacylglycerols (TAG) (B) in the blood serum of hamsters with chronic hyperlipidemia caused by a high-fat diet rich in cholesterol (HFCD). # – differences compared with the group of animals treated with HFCD statistically significant

держание ХС на 11,9 % ($p < 0,05$). Комбинированная терапия розувастатином с L-RAG при ВЖХД способствовала снижению содержания уровня ТАГ на 21,4 % ($p < 0,05$) и ХС на 18,0 % ($p < 0,05$) в сравнении с монотерапией статином (рисунки 1, А и Б).

Известно, что ХС у хомяков, как и у людей, в отличие от крыс, содержится преимущественно во фракции ХС-ЛПНП и, в меньшей степени, в ЛПВП, что обуславливает склонность к развитию атеросклероза [11].

Действительно, в экспериментах показано, что повышение уровня общего ХС в сыворотке крови хомяков на фоне ВЖХД обусловлено преимущественно за счет увеличения ХС-ЛПНП в 4 раза ($p < 0,01$). Содержание ХС-ЛПВП увеличивалось в 2,2 раза ($p < 0,01$), а ИА повышался в 1,7 раза ($p < 0,01$) (рисунки 2, А и Б, рисунок 3).

Использование L-RAG на фоне ВЖХД приводило к снижению содержания в сыворотке крови ХС-ЛПНП на 24,6 % ($p < 0,01$) (рисунок 2, А). Важно отметить, что L-RAG существенно не влиял на повышенное содержание в сыворотке крови ХС-ЛПВП (рисунок 2, Б). Снижение уровня общего ХС при курсовом применении L-RAG преимущественно за счет атерогенной фракции ХС-ЛПНП приводило к уменьшению ИА на 28,8 % ($p < 0,01$) (рисунок 3).

Эзетимиб при монотерапии на фоне ВЖХД снижал в сыворотке крови содержание ХС-ЛПНП на 40,8 % ($p < 0,05$), ХС-ЛПВП на 15,7 % ($p < 0,05$). При совместном применении с L-RAG отмечался более выраженный гиполипидемический эффект и уровень ХС-ЛПНП снижался на 48,1 % ($p < 0,01$) , ХС-ЛПВП на 26,8 % ($p < 0,01$), рассчитанный показатель ИА на 49,8 % ($p < 0,01$) (рисунки 2, А и Б, рисунок 3).

Курсовое введение розувастатина на фоне ВЖХД снижало повышенное содержание ХС-ЛПНП на 22 % ($p < 0,05$), не влияло на уровень ХС-ЛПВП, в результате чего ИА снижался на 21,6 % ($p < 0,01$). Комбинированная терапия розувастатином с L-RAG приводила к снижению ХС-ЛПНП на 33,8 % ($p < 0,05$), а ИА на 41,2 % ($p < 0,05$) (рисунки 2, А и Б, рисунок 3).

Для подтверждения механизма гиполипидемической активности полисахарида, обусловленного способностью сорбировать желчные кислоты в просвете кишечника, оценивали содержание желчных кислот в сыворотке крови хомяков. Известно, что во время пищеварения желчные кислоты, синтезированные в печени из ХС, выделяются в кишечник, откуда большая их часть абсорбируется и возвращается в печень через энтерогепатический кровоток [12]. При ВЖХД уровень желчных кислот в сыворотке крови возрастал в 2,6 раза ($p < 0,01$) (таблица 1). Включение в ВЖХД

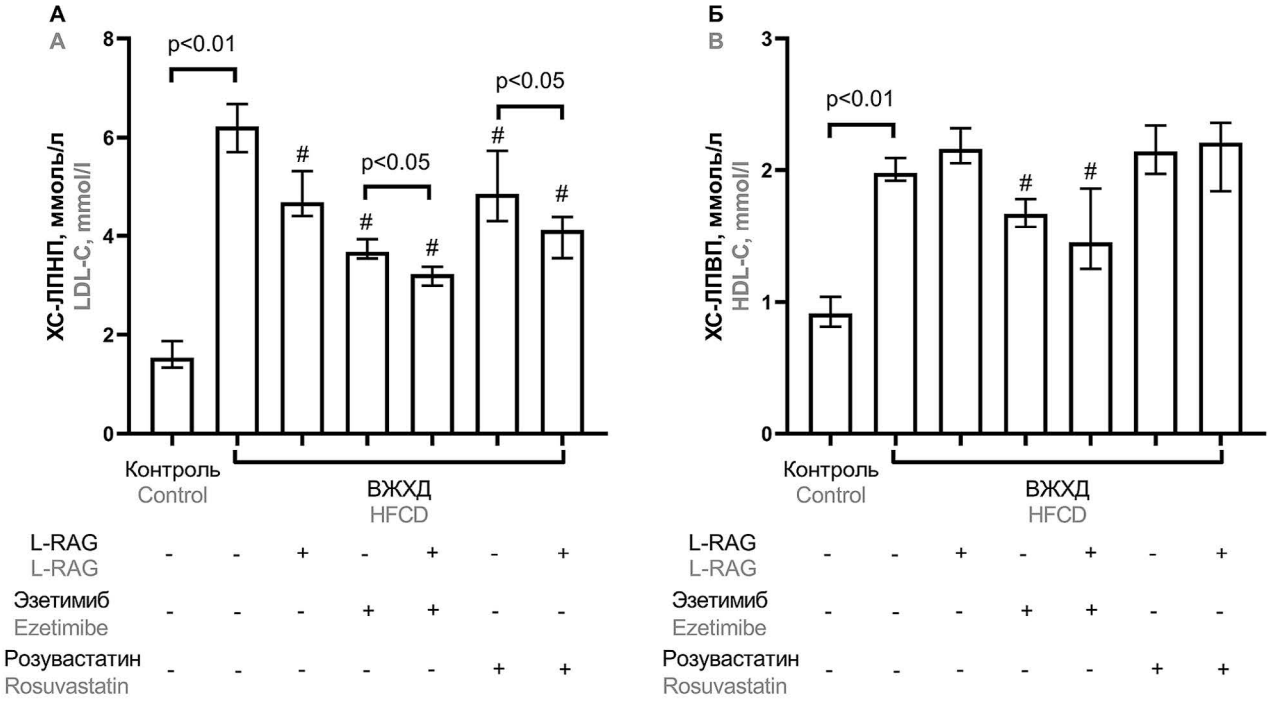


Рисунок 2. Влияние L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактоурана (L-RAG), эзетимиба, розувастатина на содержание холестерола липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) (А) и холестерола липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) (Б) в сыворотке крови хомяков с хронической гиперлипидемией, вызванной высокожировой диетой, богатой холестеролом (ВЖХД). # – различия по сравнению с группой животных, получавших ВЖХД, статистически значимы

Figure 2. The effect of L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galactouran (L-RAG), ezetimibe, rosuvastatin on the content of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) (A) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (B) in the blood serum of hamsters with chronic hyperlipidemia caused by a high-fat diet rich in cholesterol (HFCD). # – differences compared with the group of animals treated with HFCD statistically significant

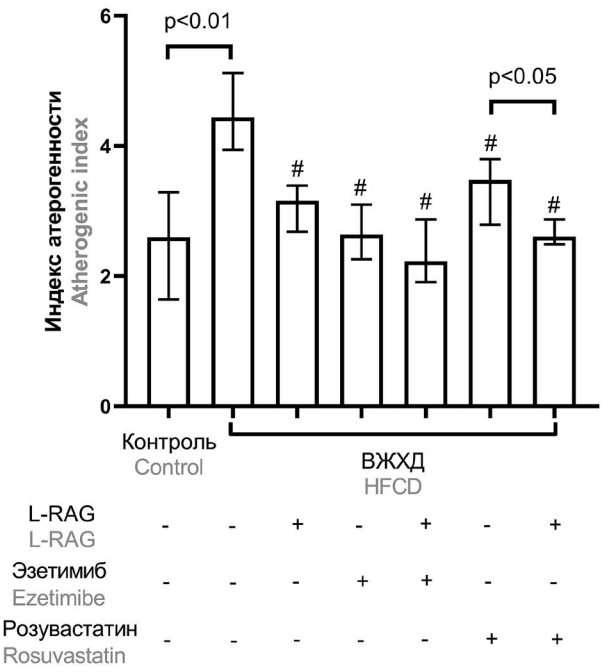


Рисунок 3. Влияние L-рамнопиранозил-6-*O*-метил-галактоурана (L-RAG), эзетимиба, розувастатина на показатель индекса атерогенности (ИА) сыворотки крови хомяков с хронической гиперлипидемией, вызванной высокожировой диетой, богатой холестеролом (ВЖХД). # – различия по сравнению с группой животных, получавших ВЖХД, статистически значимы

Figure 3. The effect of L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galactouran (L-RAG), ezetimibe, rosuvastatin on the atherogenic index (AI) of blood serum of hamsters with chronic hyperlipidemia caused by a high-fat diet rich in cholesterol (HFCD). # – differences compared with the group of animals treated with HFCD statistically significant

L-RAG приводило к снижению уровня желчных кислот в сыворотке крови хомяков на 46,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с хомяками, получавшими только ВЖХД (таблица 1). Эзетимиб при монотерапии снижал содержание желчных кислот в сыворотке крови хомяков на 44,8 % ($p < 0,05$), а при комбинированной терапии совместно с L-RAG на 62,3 % ($p < 0,05$). Розувастатин не оказывал влияние на повышенное содержание желчных кислот, но при совместном применении с L-RAG снижал в сыворотке крови уровень желчных кислот на 51,4 % ($p < 0,05$) (таблица 1).

Снижение уровня ХС-ЛПНП является основной целью фармакотерапии гиперлипидемии, и секвестранты желчных кислот были одним из первых классов препаратов, одобренных для применения с этой целью [13]. При этом, в исследованиях отмечено по-

Таблица 1. Содержание желчных кислот (мкмоль/л) в сыворотке крови хомяков с хронической гиперлипидемией, вызванной высокожировой диетой, богатой холестеролом (ВЖХД), при курсовом введении L-рамнопиранозил-6-*О*-метил-галактоурана (L-RAG), эзетимиба, розувастатина (Me (Q1-Q3), P)

Table 1. The bile acids content (μmol/l) in the blood serum of hamsters with chronic hyperlipidemia caused by a high-fat diet rich in cholesterol (HFCD), after administration of L-rhamnopyranosyl-6-*O*-methyl-galactouran (L-RAG), ezetimibe, rosuvastatin (Me (Q1-Q3), P)

Экспериментальные группы Experimental groups	**Содержание желчных кислот, мкмоль/л** Content of bile acids, μmol/l	**Уровень статистической значимости различий** Level of statistical significance of differences
1. Контроль (n = 8) 1. Control (n = 8)	20,52 (12,78–32,45)	
2. ВЖХД (n = 8) 2. HFCD (n = 8)	66,59 (52,81–85,34)	$p_{2-1} < 0,001$
3. ВЖХД + L-RAG (3 г / 100 г корма) (n = 8) 3. HFCD + L-RAG (3g / 100g of feed) (n = 8)	34,08 (30,21–39,60)	$p_{3-2} = 0,003$
4. ВЖХД + эзетимиб 2 мг/кг (n = 8) 4. HFCD + ezetimibe 2 mg/kg (n = 8)	36,72 (32,36–52,32)	$p_{4-2} = 0,040$
5. ВЖХД + L-RAG (3 г / 100 г корма) + эзетимиб 2 мг/кг (n = 8) 5. HFCD + L-RAG (3 g / 100 g of feed) + ezetimibe 2 mg/kg (n = 8)	23,44 (17,24–33,08)	$p_{5-2} < 0,001$ $p_{5-4} = 0,046$
6. ВЖХД + розувастатин 1 мг/кг (n = 8) 6. HFCD + rosuvastatin 1 mg/kg (n = 8)	58,73 (41,82–66,28)	$p_{6-2} = 0,688$
7. ВЖХД + L-RAG (3 г / 100 г корма) + розувастатин 1 мг/кг (n = 8) 7. HFCD + L-RAG (3 g / 100 g of feed) + rosuvastatin 1 mg/kg (n = 8)	32,31 (22,08–51,21)	$p_{7-2} = 0,008$ $p_{7-6} = 0,040$

вышение уровня ХС-ЛПВП в крови пациентов на фоне терапии секвестрантами желчных кислот [14].

Комбинированная фармакотерапия гиперлипидемий показана при недостижении целевых значений липидного профиля крови пациентов при монотерапии. Так, семейная гиперлипидемия связана с наиболее значительным риском прогрессирования ССЗ и требует значительного снижения уровня ХС-ЛПНП, чего часто нельзя достичь с помощью одного препарата [15]. В то же время, назначение статинов в максимальных терапевтических дозах может быть связано с увеличением частоты нежелательных побочных реакций, особенно миопатий [16]. В отдельных исследованиях показано, что на фоне терапии секвестрантами желчных кислот возможно незначительное увеличение синтеза ХС вследствие возрастания активности ГМГ-КоА-редуктазы [16]. Поэтому, совместное использование ингибитора ГМГ-КоА-редуктазы (розувастатина) и полисахарида березы L-RAG в наших экспериментах приводило к более выраженному гипохолестеролемическому эффекту (рисунки 1, А и 2, А).

Совместное применение ингибитора всасывания ХС эзетимиба и L-RAG также оказывает аддитивное влияние на снижение уровня общего ХС и ХС-ЛПНП (рисунки 1, А и 2, А). Назначение такой комбинированной терапии возможно в случае непереносимости статинов в любой дозе у пациентов [17].

В целом, преимущества использования комбинированной терапии полисахарида березы (*Betula pendula* L.) L-RAG с другими гиполипидемическими препаратами будет способствовать более высокой эффективности терапии, снижению дозировок отдельных лекарственных средств и уменьшению частоты и выраженности нежелательных побочных реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящей работы явилось исследование гиполипидемической активности комбинации субстанции полисахарида из листьев березы повислой (*Betula pendula* L.) L-рамнопиранозил-6-*О*-метил-галактуронана (L-RAG) и ингибитора ГМГ-КоА-редуктазы розувастатина или ингибитора абсорбции холестерола эзетимиба.

На модели диет-индуцированной хронической гиперлипидемии, вызванной длительным кормлением высокожировой диетой, богатой холестеролом (ВЖХД), показано, что курсовое применение L-RAG совместно с эзетимибом или розувастатином приводило к более выраженному снижению уровней холестерола (ХС), триацилглицеролов (ТАГ), холестерола липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), чем при монотерапии полисахаридом или препаратами сравнения в отдельности.

Аддитивное влияние полисахарида на снижение уровня общего ХС и ХС-ЛПНП обусловлено, главным образом, снижением уровня желчных кислот в сыворотке крови, что свидетельствует о его способности сорбировать их в просвете кишечника и прерывать энтерогепатическую циркуляцию, действуя подобно препаратам-секвестрантам желчных кислот.

Полученные данные обосновывают перспективность использования L-RAG в комплексной терапии гиперлипидемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kopin L., Lowenstein C. J. Dyslipidemia. *Annals of internal medicine*. 2017;167(11):ITC81–ITC96. DOI: 10.7326/AITC201712050.
2. Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia. *The American journal of managed care*. 2017;23(9):S139–S148.

3. Sjouke B., Hovingh G. K., Kastelein J. J., Stefanutti C. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia: prevalence, diagnosis, and current and future treatment perspectives. *Current Opinion in Lipidology*. 2015;26(3):200–209. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000179.
4. Xie J. H., Jin M. L., Morris G. A., Zha X. Q., Chen H. Q., Yi Y., Li J. E., Wang Z. J., Gao J., Nie S. P., Shang P., Xie M. Y. Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56:S60–S84. DOI: 10.1080/10408398.2015.1069255.
5. Silva I. M. V., Machado F., Moreno M. J., Nunes C., Coimbra M. A., Coreta-Gomes F. Polysaccharide Structures and Their Hypocholesterolemic Potential. *Molecules*. 2021;26(15):4559. DOI: 10.3390/molecules26154559.
6. Ровкина К. И., Кривощеков С. В., Гурьев А. М., Юсубов М. С. О., Белоусов М. В. Разработка методики получения полисахаридов из листьев березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.). *Химия растительного сырья*. 2019;3:23–31. DOI: 10.14258/jcprm.2019035420.
7. Ровкина К. И., Кривощеков С. В., Гурьев А. М., Юсубов М. С., Безверхняя Е. А., Белоусов М. В. Разработка методики количественного определения полисахаридов листьев березы. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2019;14(1(79)):47–50.
8. Ровкина К. И., Буйко Е. Е., Иванов В. В., Кайдаш О. А., Гурьев А. М., Юсубов М. С., Белоусов М. В. Гиполипидемическая активность полисахаридов растительного происхождения. *Традиционная медицина*. 2019;(2):39–44.
9. Zhang X., Qiu B., Wang Q., Sivaprasad S., Wang Y., Zhao L., Xie R., Li L., Kang W. Dysregulated Serum Lipid Metabolism Promotes the Occurrence and Development of Diabetic Retinopathy Associated With Upregulated Circulating Levels of VEGF-A, VEGF-D, and PlGF. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. 2021;22(8):779413. DOI: 10.3389/fmed.2021.779413.
10. Dillard A., Matthan N. R., Lichtenstein A. H. Use of hamster as a model to study diet-induced atherosclerosis. *Nutrition & Metabolism*. 2010;7:89. DOI: 10.1186/1743-7075-7-89.
11. Zhao Y., Qu H., Wang Y., Xiao W., Zhang Y., Shi D. Small rodent models of atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;129:110426. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110426.
12. Getz G. S., Reardon C. A. Diet and murine atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(2):242–249. DOI: 10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17.
13. Thomas C., Pellicciari R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(8):678–93. DOI: 10.1038/nrd2619.
14. Insull W. Jr. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *Southern Medical Journal*. 2006;99(3):257–73. DOI: 10.1097/01.smj.0000208120.73327.db.
15. Davidson M. H., Toth P. P. Combination therapy in the management of complex dyslipidemias. *Current Opinion in Lipidology*. 2004;15(4):423–31. DOI: 10.1097/01.mol.0000137221.16160.b9.
16. Hou R., Goldberg A. C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2009;38(1):79–97. DOI: 10.1016/j.ecl.2008.11.007.
17. Bays H., Rhyne J., Abby S., Lai Y. L., Jones M. Lipid-lowering effects of colesevelam HCl in combination with ezetimibe. *Current Medical Research and Opinion*. 2006;22(11):2191–200. DOI: 10.1185/030079906X148436.

REFERENCES

1. Kopin L., Lowenstein C. J. Dyslipidemia. *Annals of internal medicine*. 2017;167(11):ITC81–ITC96. DOI: 10.7326/AITC201712050.
2. Karr S. Epidemiology and management of hyperlipidemia. *The American journal of managed care*. 2017;23(9):S139–S148.
3. Sjouke B., Hovingh G. K., Kastelein J. J., Stefanutti C. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia: prevalence, diagnosis, and current and future treatment perspectives. *Current Opinion in Lipidology*. 2015;26(3):200–209. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000179.
4. Xie J. H., Jin M. L., Morris G. A., Zha X. Q., Chen H. Q., Yi Y., Li J. E., Wang Z. J., Gao J., Nie S. P., Shang P., Xie M. Y. Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56:S60–S84. DOI: 10.1080/10408398.2015.1069255.
5. Silva I. M. V., Machado F., Moreno M. J., Nunes C., Coimbra M. A., Coreta-Gomes F. Polysaccharide Structures and Their Hypocholesterolemic Potential. *Molecules*. 2021;26(15):4559. DOI: 10.3390/molecules26154559.
6. Rovkina K. I., Krivoshchekov S. V., Guryev A. M., Yusubov M. S. O., Belousov M. V. Development of a method for obtaining polysaccharides from birch leaves (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.). *Chemistry of plant raw materials*. 2019;3:23–31. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019035420.
7. Rovkina K. I., Krivoshchekov S. V., Guryev A. M., Yusubov M. S., Bezverkhniaia E. A., Belousov M. V. Development of a method for quantitative determination of birch leaf polysaccharides. *Bashkortostan Medical Journal*. 2019;14(1(79):47–50. (In Russ.)
8. Rovkina K. I., Buyko E. E., Ivanov V. V., Kaidash O. A., Guryev A. M., Yusubov M. S., Belousov M. V. Hypolipidemic activity of plant polysaccharides. *Traditsionnaya Meditsina*. 2019;(2):39–44. (In Russ.)
9. Zhang X., Qiu B., Wang Q., Sivaprasad S., Wang Y., Zhao L., Xie R., Li L., Kang W. Dysregulated Serum Lipid Metabolism Promotes the Occurrence and Development of Diabetic Retinopathy Associated With Upregulated Circulating Levels of VEGF-A, VEGF-D, and PlGF. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. 2021;22(8):779413. DOI: 10.3389/fmed.2021.779413.
10. Dillard A., Matthan N. R., Lichtenstein A. H. Use of hamster as a model to study diet-induced atherosclerosis. *Nutrition & Metabolism*. 2010;7:89. DOI: 10.1186/1743-7075-7-89.
11. Zhao Y., Qu H., Wang Y., Xiao W., Zhang Y., Shi D. Small rodent models of atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;129:110426. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110426.
12. Getz G. S., Reardon C. A. Diet and murine atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(2):242–249. DOI: 10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17.
13. Thomas C., Pellicciari R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(8):678–93. DOI: 10.1038/nrd2619.
14. Insull W. Jr. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *Southern Medical Journal*. 2006;99(3):257–73. DOI: 10.1097/01.smj.0000208120.73327.db.
15. Davidson M. H., Toth P. P. Combination therapy in the management of complex dyslipidemias. *Current Opinion in Lipidology*. 2004;15(4):423–31. DOI: 10.1097/01.mol.0000137221.16160.b9.
16. Hou R., Goldberg A. C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2009;38(1):79–97. DOI: 10.1016/j.ecl.2008.11.007.
17. Bays H., Rhyne J., Abby S., Lai Y. L., Jones M. Lipid-lowering effects of colesevelam HCl in combination with ezetimibe. *Current Medical Research and Opinion*. 2006;22(11):2191–200. DOI: 10.1185/030079906X148436.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-64-69
УДК 547.992.2:57.02

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Роль сигнального каскада IKK-2/NF-κB в активации перитонеальных макрофагов гуминовыми кислотами торфа

Е. С. Трофимова[1,2]✉, М. В. Зыкова[2], А. А. Лигачева[1], М. Г. Данилец[1], Е. Ю. Шерстобоев[1], А. В. Цупко[2], Д. А. Михалёв[2], М. В. Белоусов[2]

[1] НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3
[2] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ **Контактное лицо:** Трофимова Евгения Сергеевна. **E-mail:** trofimova_es@pharmso.ru

ORCID: Е. С. Трофимова – https://orcid.org/0000-0002-5367-715X; М. В. Зыкова – https://orcid.org/0000-0002-1973-8983; А. А. Лигачева – https://orcid.org/0000-0002-3337-1516; М. Г. Данилец – https://orcid.org/0000-0001-7862-4778; Е. Ю. Шерстобоев – https://orcid.org/0000-0002-6178-5329; А. В. Цупко –https://orcid.org/0000-0001-7169-8846; Д. А. Михалёв – https://orcid.org/0000-00002-5292-1368; М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 27.06.2022 **Статья принята в печать:** 15.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Макрофаги занимают особое место в формировании и координации иммунного ответа, их популяция характеризуется гетерогенностью, однако среди них выделяют два основных типа: провоспалительные (классически активированные) макрофаги М1, которые активируются интерфероном-γ (ИФН-γ) или липополисахаридом (ЛПС) бактерий, продуцируют провоспалительные цитокины, оксид азота (NO) и инициируют иммунный ответ, и противовоспалительные (альтернативно активированные) макрофаги М2, которые активируются такими цитокинами как интерлейкин 1 (ИЛ-1), ИЛ-10 или ИЛ-13 и связаны с подавлением иммунного ответа и заживлением тканей. Провоспалительные свойства макрофагов чаще всего связывают с активацией внутриклеточного сигнального каскада с участием киназного комплекса IKK-2 и ядерного фактора-κB (NF-κB), который является важнейшей молекулой сигнальной трансдукции. Ранее было показано, что гуминовые кислоты (ГК) торфа вызывают появление у макрофагов провоспалительных свойств, однако внутриклеточные механизмы такой активации не изучены.

Цель. Изучение вклада внутриклеточного сигнального каскада IKK-2/NF-κB в процесс активации провоспалительных свойств макрофагов гуминовыми кислотами торфа.

Материалы и методы. Исследования проводили с помощью культуральных методов, а также методом вестерн-блоттинга.

Результаты и обсуждение. Показано, что добавление ингибитора киназы IKK-2 в культуру макрофагов снижало способность ГК стимулировать продукцию оксида азота исследуемыми клетками. Методом вестерн-блоттинга выявлено, что через 30 минут после совместной инкубации ГК с макрофагами содержание молекулы NF-κB p65 в клетках увеличивалось, через 60 минут снижалось до показателей интактного контроля, а через 17 часов уменьшалось в 3 раза по сравнению с контрольным уровнем. Однако ингибитор IKK-2 после 30-минутной инкубации не оказывал блокирующего влияния на киназу IKK, тогда как через час после совместной инкубации клеток с ингибитором и веществами наблюдалось снижение уровня NF-κB p65. Эта тенденция сохранялась и к 17 часам.

Заключение. Стимулирующее действие гуминовых кислот торфа на макрофаги реализуется, в том числе, за счет активации киназного комплекса IKK-2 с дальнейшим высвобождением субъединицы p65 молекулы NF-κB. Прослеживается зависимость степени активации NF-κB от срока взаимодействия клетки с активирующими агентами. ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, оксид азота, IKK-2, NF-κB, иммуноблоттинг

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

Вклад авторов. М. В. Зыкова, М. В. Белоусов, М. Г. Данилец и Е. Ю. Шерстобоев обосновали актуальность работы. А. В. Цупко, Д. А. Михалёв, М. В. Зыкова синтезировали образцы и провели их стандартизацию. Е. С. Трофимова, А. А. Лигачева разработали и провели эксперимент. А. А. Лигачева участвовала в обработке данных. Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец проводили теоретические расчеты. Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец, М. В. Зыкова, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-65-47052.

Соответствие принципам этики. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации и были одобрены биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга, протокол № 98122015.

Для цитирования: Трофимова Е. С., Зыкова М. В., Лигачева А. А., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Белоусов М. В. Роль сигнального каскада IKK-2/NF-κB в активации перитонеальных макрофагов гуминовыми кислотами торфа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):64–69. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-64-69

The Role of IKK-2/NF-κB Signaling Cascade in the Activation of Peritoneal Macrophages by Humic Acids of Peat

Evgenia S. Trofimova[1,2]✉, Maria V. Zykova[2], Anastasia A. Ligacheva[1], Marina G. Danilets[1], Evgenii Yu. Sherstoboev[1], Andrey V. Tsupko[2], Dmitrii A. Mikhalev[2], Mikhail V. Belousov[2]

[1] Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMC, 3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russia
[2] Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

© Трофимова Е. С., Зыкова М. В., Лигачева А. А., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Белоусов М. В., 2022
© Trofimova E. S., Zykova M. V., Ligacheva A. A., Danilets M. G., Sherstoboev E. Yu., Tsupko A. V., Mikhalev D. A., Belousov M. V., 2022

✉ **Corresponding author:** Evgenia S. Trofimova. **E-mail:** trofimova_es@pharmso.ru

ORCID: Evgenia S. Trofimova – https://orcid.org/0000-0002-5367-715X; Maria V. Zykova – https://orcid.org/0000-0002-1973-8983; Anastasia A. Ligacheva – https://orcid.org/0000-0002-3337-1516; Marina G. Danilets – https://orcid.org/0000-0001-7862-4778; Evgenii Yu. Sherstoboev – https://orcid.org/0000-0002-6178-5329; Andrey V. Tsupko –https://orcid.org/0000-0001-7169-8846; Dmitrii A. Mikhalev – https://orcid.org/0000-00002-5292-1368; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 27.06.2022 **Revised:** 15.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Macrophages occupy a special place in the formation and coordination of the immune response, their population is characterized by heterogeneity, however, two main types are distinguished among them: pro-inflammatory (classically activated) macrophages M1, which are activated by interferon-γ (IFN-γ) or lipopolysaccharide (LPS) of bacteria, produce pro-inflammatory cytokines, nitric oxide (NO) and initiate an immune response, and anti-inflammatory (alternatively activated) macrophages M2, which are activated by such cytokines as interleukin 1 (IL-1), IL-10 or IL-13 and are associated with suppression of the immune response and tissue healing. The proinflammatory properties of macrophages are most often associated with the activation of an intracellular signaling cascade with the participation of the IKK-2 kinase complex and nuclear factor-κB (NF-κB), which is the most important signal transduction molecule. Previously, the authors showed that humic acids (HA) of peat cause the appearance of pro-inflammatory properties in macrophages; however, the intracellular mechanisms of such activation have not been studied.

Aim. Study of the contribution of the intracellular signaling cascade IKK-2/NF-κB to the activation of pro-inflammatory properties of macrophages by humic acids of peat.

Materials and methods. The studies were carried out using cultural methods and western blotting.

Results and discussion. It was shown that the addition of the IKK-2 inhibitor to the macrophage culture reduced the ability of HA to stimulate the production of nitric oxide by the cells. Western blotting revealed that after 30 minutes simultaneous incubation of HA with macrophages, the content of the NF-κB p65 molecule in the cells increased, after 60 minutes it decreased to the values of intact control, and after 17 hours it decreased 3 times compared to the control level. However, the IKK-2 inhibitor after a 30-minutes incubation did not have a blocking effect on the IKK kinase, whereas in an hour of the co-incubation of the cells with the inhibitor and substances, a decrease in the level of NF-κB p65 was observed. This trend continued in 17 hours.

Conclusion. The stimulating effect of peat humic acids on macrophages is realized, among other things, due to the activation of the IKK-2 kinase complex with further release of the p65 subunit of the NF-κB molecule. The dependence of the degree of NF-κB activation on the period of interaction of the cell with activating agents is traced. HA start the intracellular signaling cascade of the nuclear factor NF-κB already within the first 30 minutes.

Keywords: humic acids, nitric oxide, IKK-2, NF-κB, immunoblotting

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

Contribution of the authors. Maria V. Zykova, Michail V. Belousov, Marina G. Danilets and Evgenii Yu. Sherstoboev substantiated the relevance of the work. Andrey V. Tsupko, Dmitrii A. Mikhalev, Maria V. Zykova synthesized samples and carried out their standardization. Evgenia S. Trofimova, Anastasia A. Ligacheva developed and conducted the experiment. Anastasia A. Ligacheva participated in data processing. Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets performed theoretical calculations. Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets, Maria V. Zykova, Michail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. This work was carried out with financial support from the Russian Science Foundation within the framework of scientific project No. 20-65-47052.

Compliance with the principles of ethics. Experiments using laboratory animals were carried out in compliance with the principles of humanity set out in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Helsinki Declaration and were approved by the Bioethical Committee of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, protocol No. 98122015.

For citation: Trofimova E. S., Zykova M. V., Ligacheva A. A., Danilets M. G., Sherstoboev E. Yu., Tsupko A. V., Mikhalev D. A., Belousov M. V. The role of IKK-2/NF-κB signaling cascade in the activation of peritoneal macrophages by humic acids of peat. *Drug development & registration*. 2022;11(3):64–69. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-64-69

ВВЕДЕНИЕ

Путь передачи сигналов с помощью ядерного фактора-κB (NF-κB) является одним из наиболее значимых внутриклеточных механизмов, связанных с развитием иммунных реакций. Сигнальный путь NF-κB активируется многочисленными экзогенными и эндогенными стимулами и является ключевым в регуляции воспалительной реакции на патогены и раковые клетки, а также аутоиммунных заболеваний. Семейство NF-κB состоит из пяти мономеров NF-κB (RelA/p65, RelB, cRel, NF-κB1 p50 и NF-κB2 p52), которые могут димеризоваться с образованием до 15 уникальных факторов транскрипции. В покоящихся клетках ядерный фактор находится в цитоплазме в виде гетеродимера, инактивированного ингибиторным белком IκB. Стимуляция цитокиновых или паттерн-распознающих рецепторов приводит к фосфорилированию киназного комплекса IκB (IKK-2), который состоит из субъединиц IKK-β и NEMO (известный как IKK-γ). Активация IKK-β приводит к фосфорилированию IκB, убиквинированию, протеасомальной деградации и высвобождению NF-κB с последующей транслокацией в ядро и запуску транскрипции генов [1–5].

В последнее время гуминовые кислоты (ГК) стали широко использоваться в экспериментальной медицине как объект для исследований. Выявлено их гепа-

топротекторное, антиоксидантное, антибактериальное, адаптогенное, ранозаживляющее действие [6]. Кроме того, показано, что *in vitro* ГК обладают противовирусной активностью против вирусов герпеса 1 и 2 типов (HSV1, HSV2), респираторного и цитомегаловируса человека (HCMV, RSV) [7], проявляют иммуномодулирующие свойства на фоне применения антибиотиков, а также способствуют усилению сосудообразования [8].

Ранее было доказано, что ГК торфа усиливают продукцию оксида азота макрофагами (МФ), подавляют в них активность аргиназы, а также стимулируют секрецию ряда провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-12, ФНО-α, ИФН-γ) и снижают продукцию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10) иммунокомпетентными клетками [3, 4]. Иными словами, ГК торфа вызывают активацию макрофагов по классическому пути и появление у них провоспалительных свойств, но внутриклеточные механизмы такой активации почти не изучены. Поляризация МФ зависит от целого ряда путей сигнальной внутриклеточной трансдукции, в частности, MAP киназ, JNK, PI3-киназы/Akt, NOTCH, JAK/STAT, TGF-β, TLR/NF-κB и HIF [9, 10]. Однако провоспалительные свойства макрофагов чаще всего связывают с передачей сигнала с помощью молекулы NF-κB [2].

В связи с этим целью нашего исследования было изучение вклада внутриклеточного сигнального каскада IKK-2/NF-κB в процесс активации макрофагов гуминовыми кислотами торфа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ГК, которые получали из образцов верхового торфа болота «Васюганское», Томской области, которые отличались друг от друга местом отбора, глубиной отбора, степенью разложения торфа и зольностью: ГК-1 (сфагново-мочажинный торф, мочажина грядово-мочажинного комплекса, глубина отбора 20–70 см; степень разложения 5–10 %; зольность 2,77 %), ГК-2 (сосново-пушицевый торф, высокий рям, глубина отбора 10–50 см; степень разложения 30–35 %; зольность 7,25 %), ГК-3 (магелланикум торф, гряда грядово-мочажинного комплекса, глубина отбора 100–120 см; степень разложения 10–15 %; зольность 2,66 %). Образцы высушивали при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, измельчали в роторно-ножевой мельнице, просеивали через сито (диаметр 3 мм), обрабатывали 0,1 моль/л раствором натрия пирофосфата в массовом соотношении 1:100, перемешивали в течение 8 часов в реакторе Р-100 при температуре 25–27 °С, отделяли жидкую фазу (экстракт) ГК от твердых остатков торфа вакуумной фильтрацией (нутч-фильтр), обрабатывали экстракт кислотой хлороводородной до pH 1-2, осаждали центрифугированием, отмывали осадок водой очищенной до pH 7 и высушивали при комнатной температуре.

Исследования проводили на перитонеальных макрофагах мышей линии C57BL/6 8–10 недель (НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ), которые выделяли из брюшной полости промыванием ледяным раствором хлорида натрия. Из полученной перитонеальной взвеси выделяли зрелые МФ с помощью набора EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антител, специфических к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (оба «Stem Cell», Канада, кат. № 17683, № 60027BT). Далее макрофаги ($2{,}5–3 \times 10^6$) культивировали в 96-луночных планшетах при 37 °С в атмосфере с 5%-м CO_2 и абсолютной влажности в среде, состоящей из RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10%-м ЭТС (HyClone, США), 20 мМ HEPES (Sigma-Aldrich, США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich, США) и 2 мМ L-глютамина (Sigma-Aldrich, США), в присутствии образцов ГК и/или ингибитора IKK-2 в концентрации 20 нМ (Calbiochem, США, кат. № 401481), а также стандартного активатора – ЛПС (0,1 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США, серотип O111:B4). Через 2 суток после инкубации из лунок собирали надосадок, смешивали с эквивалентным объемом реактива Грисса (Sigma-Aldrich, США) и измеряли содержание нитритов при помощи анализатора иммуноферментных реакций Униплан (АИФР-01, ЗАО «Пикон», Россия) при длине волны 540 нм.

Для определения уровня NF-κB макрофаги инкубировали с исследуемыми веществами как описано выше в течение 30, 60 минут и 17 часов, затем собирали, отмывали фосфатно-солевым буфером и разрушали RIPA буфером (Abcam, Великобритания), содержащим коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз. Полученные лизаты разделяли на белковые фракции с помощью SDS-PAGE. Белки из геля переносили полусухим переносом на PVDT мембрану Immun-Blot® (Bio-Rad, США), затем блокировали мембрану 5%-м раствором BSA (Sigma-Aldrich, США). После этого мембрану инкубировали с первичными антителами Anti-NF-κB p65 (Abcam, Великобритания, кат. № ab16502), а затем со вторичными HRP Goat anti-Rabbit IgG (Cedarlane, Канада, кат. № CLGRHRP). В качестве контроля загрузки использовали Anti-β-Actin-Peroxidase антитела (Sigma-Aldrich, США, кат. № A3854). Визуализацию проводили при помощи хемилюминесцентного субстрата Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Денситометрический анализ выполняли с использованием гель-документирующей системы G:BOX Chemi XRQ (Syngene, Великобритания) и программного обеспечения Gene-Tools (Syngene, Великобритания).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета Statistica 13.3, используя критерий Даннета. Проверка на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для каждой выборки вычисляли выборочное среднее (M), ошибку среднего (m), различия считали достоверными при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе была определена способность гуминовых кислот и ЛПС (в качестве стандартного активатора макрофагов) стимулировать продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами. Все исследуемые гуминовые кислоты и ЛПС после совместной инкубации в течение 48 часов их с клетками достоверно повышали концентрацию нитритов в супернатантах. Однако ингибитор IKK-2 не оказывал влияния на ЛПС-стимулированную продукцию оксида азота, но при этом снижал стимулирующие свойства ГК (таблица 1). Вероятно, механизм стимулирующего действия ГК на макрофаги отличается от механизма действия ЛПС и в большей степени связан с сигнальным каскадом IKK-2/NF-κB. А действие ЛПС реализуется за счет других сигнальных каскадов или других мономеров молекулы NF-κB, либо с участием субъединицы α киназного комплекса ингибитора κB (IKK-α).

Таблица 1. Влияние ингибитора IKK-2 на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии C57/BL6, стимулированными гуминовыми кислотами (M ± m)

Table 1. Effect of IKK-2 inhibitor on nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57/BL6 mice stimulated with humic acids (M ± m)

Исследуемое вещество Test substance	Концентрация, мкг/мл Concentration, μg/ml	Концентрация нитритов, мкМ Nitrite concentration, μM	
		Инкубация без ингибитора Incubation without inhibitor	Инкубация с ингибитором IKK-2 Incubation with IKK-2 inhibitor
Среда (контроль) Medium (control)	–	3,75 ± 0,19	3,32 ± 0,06
ЛПС LPS	0,1	15,85 ± 0,20*	16,67 ± 0,06
ГК-1 HA-1	10	17,36 ± 0,28*	14,45 ± 0,13■
ГК-2 HA-2	100	14,54 ± 0,23*	8,42 ± 0,07■
ГК-3 HA-3	10	18,10 ± 0,31*	13,99 ± 0,09■

Примечание. * Различия показателя со средой без ингибитора, $p < 0,05$; ■ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без ингибитора; $p < 0,05$; $n = 5$.

Note. * Differences with the medium without an inhibitor, $p < 0.05$; ■ – differences with the incubation of each substance without an inhibitor; $p < 0.05$; $n = 5$.

Для дальнейшего исследования внутриклеточной активации NF-κB с помощью иммуноблоттинга нами была выбрана гуминовая кислота ГК-2, поскольку ингибитор IKK-2 наиболее эффективно отменял ее стимулирующее действие. Было выявлено, что ГК-2 вызывала увеличение содержания субъединицы p65 молекулы NF-κB в макрофагах через 30 минут после совместной инкубации в 1,3 раза относительно интактных клеток. Через 60 минут уровень p65 снижался до показателей интактного контроля, а после 17 часов инкубации был в 3 раза ниже контрольного уровня. Динамика изменений уровня NF-κB после стимуляции клеток ЛПС была аналогичной (рисунок 1). Таким образом, ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут, а значительное снижение содержания молекулы NF-κB в клетке к 17 часам, вероятно, связано с включением механизмов обратной связи и деградацией молекулы. Такие механизмы, например, могут напрямую зависеть от локальной концентрации NO [11]. А их биологический смысл, вероятно, заключается в прекращении иммунного ответа с целью ограничения повреждения собственных тканей.

При добавлении в культуру клеток ингибитора IKK-2 после 30-минутной инкубации он не оказывал блокирующего влияния на киназу IKK, поскольку уровень NF-κB p65 в макрофагах не только не уменьшался, но даже увеличивался под действием гуминовой кислоты и ЛПС по сравнению с контролем. Тогда как через час совместной инкубации клеток с ингибитором и веществами наблюдалось снижение уровня NF-κB p65. Эта тенденция сохранялась и к 17 часам (рисунок 2). Исходя из этих результатов, можно сделать вывод о том, что активирующее действие ГК происходит в течение 30 минут, а для реализации блокирующего действия ингибитора IKK-2 требуется не менее часа. Снижение уровня NF-κB после 17 часовой инкубации макрофагов с ГК и ингибитором IKK-2 мы связываем с тем, что к этому сроку наблюдается уменьшение экспрессии NF-κB даже без добавления ингибитора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что стимулирующее действие гуминовых кислот торфа на антигенпрезентирующие клетки в большой степени реализуется за счет активации киназного комплекса IKK-2 с дальнейшим высвобождением субъединицы p65 молекулы NF-κB. Более того, прослеживается зависимость степени активации NF-κB от продолжительности действия активирующих агентов на клетки. Показано, что ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут. В отличие от ЛПС механизм стимулирующего действия ГК на макрофаги в большей степени связан с сигнальным каскадом IKK-2/NF-κB, поскольку одновременная инкубация клеток с митогеном и ингибитором IKK-2 не снижала выработку оксида азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J. T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology.* 2018;233(9):6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.

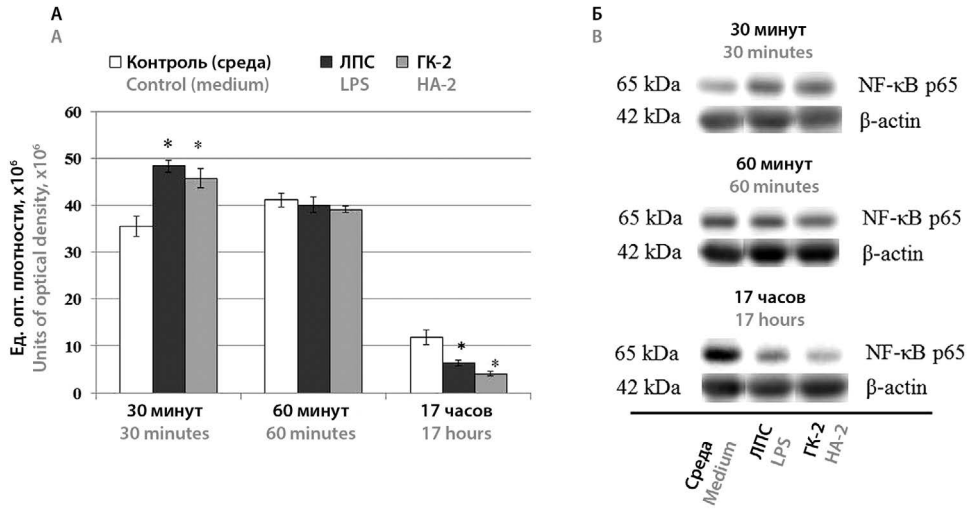


Рисунок 1. Определение уровня NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах мышей на разных сроках активации гуминовой кислотой торфа методом иммуноблоттинга.

А – относительное содержание NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах, выявленное с помощью денситометрических измерений на иммуноблотах; Б – репрезентативные для каждой группы полосы иммуноблота.

Примечание. * Различия показателя с контролем, $p < 0,05$; $n = 3$

Figure 1. Determination of NF-κB p65 in peritoneal macrophages of mice at different periods of activation by humic acid of peat by the method of immunoblotting.

A – relative content of NF-κB p65 in peritoneal macrophages, revealed by densitometric measurements on immunoblotts; B – representative immunoblot bands for each group.

Note. * Differences with control, $p < 0.05$; $n = 3$

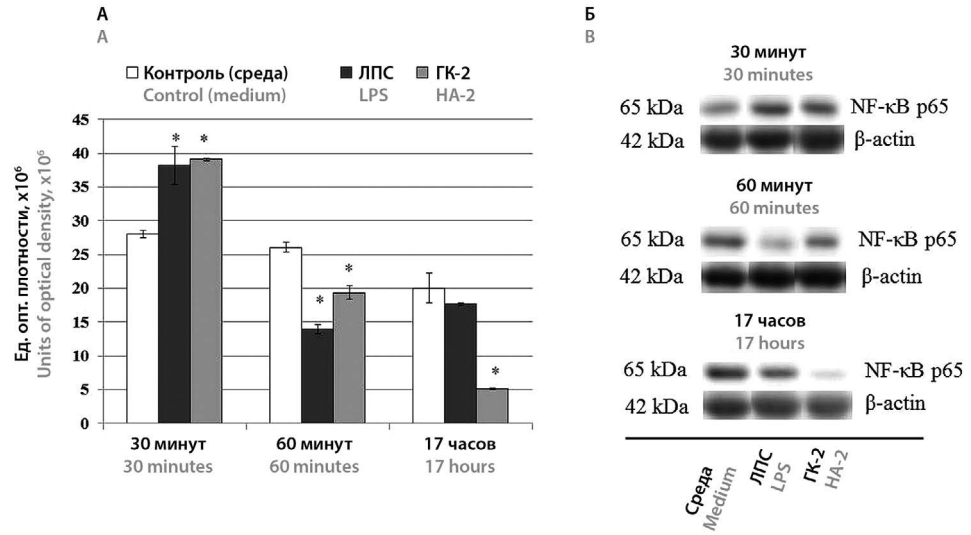


Рисунок 2. Определение уровня NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах мышей на разных сроках активации гуминовой кислотой торфа в присутствии ингибитора IKK-2 методом иммуноблоттинга.

А – относительное содержание NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах, выявленное с помощью денситометрических измерений на иммуноблотах; Б – репрезентативные для каждой группы полосы иммуноблота.

Примечание. * Различия показателя со средой, $p < 0,05$; $n = 3$

Figure 2. Determination of NF-κB p65 in peritoneal macrophages of mice at different periods of activation by humic acid in peat in the presence of IKK-2 inhibitor by immunoblotting.

A – relative content of NF-κB p65 in peritoneal macrophages, revealed by densitometric measurements on immunoblots; B – representative immunoblot bands for each group.

Note. * Differences with medium, $p < 0.05$; $n = 3$

2. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S. C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2017;2(17023). DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
3. Trofimova E. S., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Y., Zhdanov V. V., Danilets M. G., Dygai A. M., Zykova M. V., Belousov M. V., Yusubov M. S., Krivoshchekov S. V. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017;162(6):741–745. DOI: 10.1007/s10517-017-3702-5.
4. Trofimova E. S., Zykova M. V., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Ligacheva A. A., Belousov M. V. Effects of Humic Acids, Isolated from High-Moor Pine-Peat Moss-Cotton Grass Peat on the Production of Cytokines by Mouse and Human Immunocompetent Cells and on Humoral Immune Response. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2020;168(5):651–653. DOI: 10.1007/s10517-020-04772-2.
5. Dorrington M. G., Fraser I. D. C. NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in immunology.* 2019;10:705. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00705.
6. Зыкова М. В., Логвинова Л. А., Белоусов М. В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения. *Традиционная медицина*. 2018;2(53):27–38.
7. Cagno V., Donalisio M., Civra A., Cagliero C., Rubiolo P., Lembo D. In vitro evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology.* 2015;166:129–134. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.019.
8. Radomska-Leśniewska D. M., Skopińska-Różewska E., Jóźwiak J., Demkow U., Bałan B. J. Angiomodulatory properties of some antibiotics and Tołpa Peat Preparation. *Central-European Journal of Immunology.* 2016;41(1):19–24. DOI: 10.5114/ceji.2016.58312.
9. Малышев И. Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015;59(2):99–111.
10. Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014;26(2):192–197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.
11. Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A. J. Biphasic Regulation of NF-κB Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology.* 2001;166(6):3873–3881. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3873.

REFERENCES

1. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J. T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology.* 2018;233(9):6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.
2. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S. C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2017;2(17023). DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
3. Trofimova E. S., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Y., Zhdanov V. V., Danilets M. G., Dygai A. M., Zykova M. V., Belousov M. V., Yusubov M. S., Krivoshchekov S. V. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017;162(6):741–745. DOI: 10.1007/s10517-017-3702-5.
4. Trofimova E. S., Zykova M. V., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Ligacheva A. A., Belousov M. V. Effects of Humic Acids, Isolated from High-Moor Pine-Peat Moss-Cotton Grass Peat on the Production of Cytokines by Mouse and Human Immunocompetent Cells and on Humoral Immune Response. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2020;168(5):651–653. DOI: 10.1007/s10517-020-04772-2.
5. Dorrington M. G., Fraser I. D. C. NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in immunology.* 2019;10:705. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00705.
6. Zykova M. V., Logvinova L. A., Belousov M. V. High-molecular-weight compounds of humic nature – promising bioactive compounds. *Traditsionnaya meditsina*. 2018;2(53):27–38. (In Russ.)
7. Cagno V., Donalisio M., Civra A., Cagliero C., Rubiolo P., Lembo D. In vitro evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology.* 2015;166:129–134. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.019.
8. Radomska-Leśniewska D. M., Skopińska-Różewska E., Jóźwiak J., Demkow U., Bałan B. J. Angiomodulatory properties of some antibiotics and Tołpa Peat Preparation. *Central-European Journal of Immunology.* 2016;41(1):19–24. DOI: 10.5114/ceji.2016.58312.
9. Malyshev I. Yu Phenomena and signaling mechanisms of macrophage reprogramming. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2015;59(2):99–111. (In Russ.)
10. Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014;26(2):192–197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.
11. Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A. J. Biphasic Regulation of NF-κB Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology.* 2001;166(6):3873–3881. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3873.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-70-74
UDC 615.22

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Antithrombotic Activity of an Indolinone Derivative – a Soluble Guanylate Cyclase Stimulator

Vladimir V. Bykov[1,2]✉, Arina V. Bykova[1], Vera I. Smolyakova[3], Galina A. Chernysheva[3], Oleg I. Alyev[3], Anna M. Anishenko[2,3], Anastasia V. Sidekhmenova[3], Sergey A. Stankevich[1], Veniamin A. Khazanov[1], Aleksander I. Vengerovsky[2]

[1] LLC "Innovative Pharmacology Research", 79/4, Elizarovikh str., Tomsk, 634021, Russia
[2] Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia
[3] Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMC, 3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir V. Bykov. **E-mail:** vladimir.b.1989@gmail.com

ORCID: Vladimir V. Bykov – https://orcid.org/0000-0002-5145-2184; Arina V. Bykova – https://orcid.org/0000-0002-8495-8560; Vera I. Smolyakova – https://orcid.org/0000-0001-9501-4664; Galina A. Chernysheva – https://orcid.org/0000-0002-6438-5734; Oleg I. Alyev – https://orcid.org/0000-0001-9788-1235; Anna M. Anishenko https://orcid.org/0000-0002-8377-4129; Anasrasia V. Sidekhmenova – https://orcid.org/0000-0003-3171-667X; Sergey A. Stankevich – https://orcid.org/0000-0003-1313-4967; Veniamin A. Khazanov – https://orcid.org/0000-0002-8833-785X; Aleksander I. Vengerovsky – https://orcid.org/0000-0001-5094-3742.

Received: 27.06.2022 **Revised:** 10.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The article presents the results of studying the antithrombotic activity of a novel drug, a soluble guanylate cyclase stimulator (codename – GRS), in experimental models of arterial and venous thrombosis and thromboembolism.

Aim. Study the antithrombotic action of GRS compound in comparison with clopidogrel and rivaroxaban in the following models: arterial thrombosis induced by iron chloride application to carotid artery wall in rats; thromboembolism induced by intravenous administration of thrombin solution in mice; venous thrombosis induced by the ligature of inferior vena cava in rats.

Materials and methods. Arterial thrombosis was modelled in rats by applying a pad soaked in iron chloride ($FeCl_3$) to the carotid artery, GRS compound was administered orally in median effective dose of 10 mg/kg once 3 hours before pad application. Blood flow in carotid arteries and blood clot mass were registered. Thromboembolism was induced in mice by intravenous administration of thrombin solution, GRS in dose 10 mg/kg or the reference drug clopidogrel were administered once orally daily for 3 days. Animal mortality, survival time and blood clot size were registered. Venous thrombosis was induced in rats by the ligature of inferior vena cava below renal veins, GRS in dose 10 mg/kg, reference drug rivaroxaban in 5 mg/kg dose or their combination in these doses were administered once orally 1 hour before vein ligature. The mass of dry and wet blood clots was registered.

Results and discussion. In arterial thrombosis model GRS compound in 10 mg/kg, administered 3 hours before iron chloride application, increased the time to blood flow cessation in the carotid artery by 35 % and reduced the frequency of complete artery occlusion by 2 times compared to the control group ($p < 0.05$). 60 min after arterial thrombosis modelling complete occlusion was observed in 28 % of animals in GRS group and in 75 % of control animals, while after 24 hours the occlusion was observed in 14 % of animals in GRS group and in 50 % of control group animals ($p < 0.05$). In thrombin-induced thromboembolism model in mice GRS did not reduce the size of blood clots in pulmonary vessels, while clopidogrel reduced it by 48 %. In GRS group 80 % of animals died of thrombosis, compared to 30 % in clopidogrel group and 90 % in the control group. In ligature-induced venous thrombosis in rats GRS after single oral administration reduced the mass of dry blood clot, being as potent as rivaroxaban. Combined administration of GRS and rivaroxaban did not enhance their antithrombotic action.

Conclusion. GRS after single oral administration in 10 mg/kg dose had potent antithrombotic action in models of arterial and venous thrombosis in rats, while not preventing pulmonary vessel thrombosis in mice after thrombin administration. Therapeutic action of GRS in experimental venous thrombosis was as potent as that of rivaroxaban. Antithrombotic action of GRS compound results not only from its antiplatelet action, but also from the alleviation of endothelial dysfunction in arteries and veins.

Keywords: indolinone derivative, guanylate cyclase stimulator, rivaroxaban, clopidogrel, models of arterial and venous thrombosis and thromboembolism

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. Vladimir V. Bykov has developed the concept and design of the manuscript. Arina V. Bykova, Vera I. Smolyakova, Galina A. Chernysheva, Oleg I. Alyev, Anna M. Anishenko and Anasrasia V. Sidekhmenova have performed the experiments. Aleksander I. Vengerovsky has edited the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bykov V. V., Bykova A. V., Smolyakova V. I., Chernysheva G. A., Alyev O. I., Anishenko A. M., Sidekhmenova A. V., Stankevich S. A., Khazanov V. A., Vengerovsky A. I. Antithrombotic activity of an indolinone derivative – a soluble guanylate cyclase stimulator. *Drug development & registration.* 2022;11(3):70–74. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-70-74

Антитромботическая активность производного индолинона – стимулятора растворимой гуанилатциклазы

В. В. Быков[1,2]✉, А. В. Быкова[1], В. И. Смольякова[3], Г. А. Чернышева[3], О. И. Алиев[3], А. М. Анищенко[2,3], А. В. Сидехменова[3], С. А. Станкевич[1], В. А. Хазанов[1], А. И. Венгеровский[2]

[1] ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), 634021, Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, д. 79/4
[2] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
[3] НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

© Bykov V. V., Bykova A. V., Smolyakova V. I., Chernysheva G. A., Alyev O. I., Anishenko A. M., Sidekhmenova A. V., Stankevich S. A., Khazanov V. A., Vengerovsky A. I., 2022
© Быков В. В., Быкова А. В., Смольякова В. И., Чернышева Г. А., Алиев О. И., Анищенко А. М., Сидехменова А. В., Станкевич С. А., Хазанов В. А., Венгеровский А. И., 2022

✉ **Контактное лицо:** Быков Владимир Валерьевич. **E-mail:** vladimir.b.1989@gmail.com

ORCID: В. В. Быков – https://orcid.org/0000-0002-5145-2184; А. В. Быкова – https://orcid.org/0000-0002-8495-8560; В. И. Смольякова – https://orcid.org/0000-0001-9501-4664; Г. А. Чернышева – https://orcid.org/0000-0002-6438-5734; О. И. Алиев – https://orcid.org/0000-0001-9788-1235; А. М. Анищенко – https://orcid.org/0000-0002-8377-4129; А. В. Сидехменова – https://orcid.org/0000-0003-3171-667X; С. А. Станкевич – https://orcid.org/0000-0003-1313-4967; В. А. Хазанов – https://orcid.org/0000-0002-8833-785X; А. И. Венгеровский – https://orcid.org/0000-0001-5094-3742.

Статья поступила: 27.06.2022 **Статья принята в печать:** 10.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В статье представлены результаты исследований антитромботической активности разрабатываемого лекарственного средства – стимулятора растворимой гуанилатциклазы (шифр – GRS) на экспериментальных моделях артериального и венозного тромбоза и тромбоэмболии.

Цель. Изучить в эксперименте способность соединения GRS в сравнении с действием клопидогрела и ривароксабана оказывать антитромботическое действие на моделях артериального тромбоза, вызванного у крыс аппликацией на стенку сонной артерии хлорида железа, при тромбоэмболии, вызванной у мышей внутривенным введением раствора тромбина, и венозном тромбозе, вызванном у крыс перевязкой нижней полой вены.

Материалы и методы. Артериальный тромбоз моделировали аппликацией на сонную артерию крыс тампона, смоченного хлоридом железа ($FeCl_3$), соединение GRS в средней эффективной дозе 10 мг/кг вводили в желудок однократно за 3 ч до аппликации тампона. Регистрировали кровоток по общим сонным артериям и определяли массу тромбов. Тромбоэмболию вызывали внутривенным введением мышам раствора тромбина, соединение GRS в дозе 10 мг/кг или препарат сравнения клопидогрел вводили в желудок в течение 3 дней 1 раз в день. Регистрировали количество погибших животных, время до наступления их гибели и площадь тромбов. Для моделирования венозного тромбоза у крыс перевязывали нижнюю полую вену ниже почечных вен, соединение GRS в дозе 10 мг/кг или препарат сравнения ривароксабан в дозе 5 мг/кг, также оба вещества вместе в тех же дозах вводили в желудок однократно за 1 ч до перевязки вены. Определяли массу влажных и сырых тромбов.

Результаты и обсуждение. На модели артериального тромбоза соединение GRS в дозе 10 мг/кг при введении за 3 ч до аппликации хлорида железа на стенку сонной артерии на 35 % удлиняло время до остановки кровотока в сонной артерии и в 2 раза уменьшало частоту ее полной окклюзии по сравнению с показателями в контрольной группе ($p < 0,05$). Через 60 мин и 24 ч после моделирования артериального тромбоза полная окклюзия сосуда определялась у 28 и 14 % животных, получавших соединение GRS, и у 75 и 50 % контрольных животных ($p < 0,05$). На модели тромбоэмболии, вызванной внутривенным введением мышам тромбина, соединение GRS не уменьшало площадь тромбов в сосудах легких, клопидогрел уменьшал ее на 48 %. При введении соединения GRS от тромбоза погибало 80 % мышей, при введении клопидогрела – 30 %, в контроле – 90 %. На фоне экспериментального венозного тромбоза у крыс, вызванного перевязкой нижней полой вены, соединение GRS при однократном введении в желудок уменьшало массу высушенного тромба не слабее ривароксабана. При совместном введении соединения GRS и ривароксабана антитромботическое действие не усиливалось.

Заключение. Соединение GRS при однократном введении в желудок в дозе 10 мг/кг проявляло выраженное антитромботическое действие на моделях артериального и венозного тромбоза у крыс и не препятствовало тромбозу сосудов легких мышей при введении тромбина. Лечебное действие соединения GRS при экспериментальном венозном тромбозе не слабее, чем эффект ривароксабана. Антитромботическая активность соединения GRS обусловлена не только антиагрегантным влиянием, но и уменьшением дисфункции эндотелия артерий и вен.

Ключевые слова: производное индолинона, стимулятор гуанилатциклазы, ривароксабан, клопидогрел, модели артериального, венозного тромбоза и тромбоэмболии

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

Вклад авторов. В. В. Быков разработал концепцию и дизайн рукописи статьи. А. В. Быкова, В. И. Смольякова, Г. А. Чернышева, О. И. Алиев, А. М. Анищенко, А. В. Сидехменова выполнили эксперименты. А. И. Венгеровский редактировал статью. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Для цитирования: Быков В. В., Быкова А. В., Смольякова В. И., Чернышева Г. А., Алиев О. И., Анищенко А. М., Сидехменова А. В., Станкевич С. А., Хазанов В. А., Венгеровский А. И. Антитромботическая активность производного индолинона – стимулятора растворимой гуанилатциклазы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):70–74. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-70-74

INTRODUCTION

Antiplatelet (also called antiplatelet) drugs inhibit the adhesion, activation and aggregation of platelets. Their mechanism of action is mainly based on blocking purine receptors $P2Y_{12}$ and glycoprotein receptors IIb/IIIa on platelet membrane, inhibiting the synthesis of thromboxane A_2 inside platelets, increasing the levels of adenosine and cyclic adenosine monophosphate. One of the dangerous adverse effects of antiplatelets is severe bleeding, arising in 1–2 % of patients receiving antiplatelet therapy [1].

This necessitates the development of effective and safe antiplatelet drugs, able to block different stages of hemostasis. The new antithrombotic drug, an indolinone derivative codenamed GRS, differs in its mechanism of action from the known antiplatelet drugs. Independently of nitric oxide it stimulates soluble guanylate cyclase (sGC) in the cytoplasm of platelets, endothelium and vascular smooth muscle and increases the synthesis of cyclic guanosine monophosphate (sGMP). This cyclic nucleotide activates calcium-dependent ATPase of platelet granules and sarcoplasmic reticulum with subsequent deposition

of calcium ions, it also participates in phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), reduces vascular tone and platelet cytoskeleton mobility [2].

GRS compound has successfully completed Phase I clinical trials in healthy volunteers and is currently in Phase II clinical trials in patients with ischemic heart disease, undergoing endovascular revascularization of coronary arteries.

Study goal – assess the antithrombotic action of GRS compound in comparison with clopidogrel and rivaroxaban in the following models: arterial thrombosis induced by iron chloride application to carotid artery wall in rats; thromboembolism induced by intravenous administration of thrombin solution in mice; venous thrombosis induced by the ligature of inferior vena cava in rats.

MATERIALS AND METHODS

Test article

GRS (figure 1) substance is (2-[2-[(5RS)-5-(hydroxymethyl)-3-methyl-1,3-oxazolidine-2-yliden]-2-cyanoethylidene]-1H-indole-3(2H)-one, lot 10320, assay 100.53 %, synthesized by J.S.C. "Organica" (Novokuznetsk, Russia). LD_{50} of GRS in rats is over 5000 mg/kg.

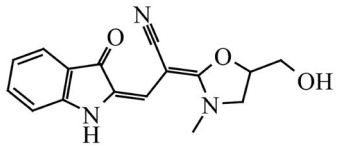


Figure 1. Structural formula of GRS

Animals

Studies were performed in the R&D center of IPHAR and Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine using 48 outbred male Sprague-Dawley rats with body mass 275–300 g and 35 male CD-1 mice with body mass 20-22 g. The animals were divided into 9 groups of 5–10 animals each, kept in plastic cages (4–5 animals per cage) at temperature 18–20 °C, relative humidity 45–65 %, air exchange 15 changes per hour and lighting mode 12:12 h.

The study was approved by institutional review boards of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (decision № 63012014 dated 30.01.2014), Siberian State Medical University (decision № 5378 dated 24.10.2016) and of IPHAR (decision № 59/2020 dated 14.08.2020) and is performed in accordance with the requirements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (Directive 2010/63/EU) and the principles of Good Laboratory Practice (Eurasian Economic Commission decision N 81 dated 03.11.2016 and GOST 33044–2014). Surgery and manipulations were performed under diethyl ether anesthesia. The animals were sacrificed by diethyl ether overdose.

Arterial thrombosis model

The animals (rats) were divided into 2 groups of 8 animals. 3 hours before surgery the animals were administered GRS compound orally in median effective dose 10 mg/kg [2] as a suspension in 0.5 % aqueous solution of carboxymethyl cellulose (Ashland, USA, lot C181411). Control group rats received the same volume of carboxymethyl cellulose solution. Arterial thrombosis was modelled by applying a 1.5 mg cotton wool pad, soaked in 10 % iron chloride solution ($FeCl_3$, Sigma-Aldrich, USA, CAS 7705-08-0), to the carotid artery wall of rats [3]. The tissues surrounding the pad were covered by polyethylene film. After 15 minutes the pad was removed, the application site was washed with isotonic sodium chloride solution. After 60 min and 24 hours the blood flow in common carotid arteries was measured for 1 hours using electromagnetic blood flow meter MFV-1100 (Nihon Kohden, Japan) with graph registration using KSP-4 recorder (Teplopribor, Russia). The blood clot was then removed from the carotid artery, washed with isotonic sodium chloride solution, dried in a dry-air thermostat TS-1/20 SPU (Smolensk SCTB SPU, Russia) to constant mass at 60 °C for 24 hours and weighed on laboratory scales (Adventurer AR2140 Ohaus Corp., USA).

Thromboembolism model

The animals (mice) were divided into 4 groups of 10 animals. The animals were administered GRS compound in 10 mg/kg dose or clopidogrel (Plavix®, 75 mg film-coated tablets, Sanofi Winthrop Industry, France, lot AA686, expiration date – 01.04.2023) in median effective dose 10 mg/kg once orally for 3 days [4]. Control group rats received 0.5 % aqueous carboxymethyl cellulose solution. 3 hours after the last test article administration, the animals were infused 0.12 ml of thrombin solution (500 U/ml, Technology-Standard, Russia, lot E009031) in 60 U/animal dose [5]. Animal survival time and mortality were measured for 15 min. Mice still alive after 15 min were considered "survived" and were sacrificed. Animal lungs were histologically studied on dewaxed slices stained with hematoxylin (Biovitrum, Russia, lot 1436) and eosin (MiniMed, Russia, lot 70). Samples were examined using Carl Zeiss Axio Lab A1 microscope (Carl Zeiss, Germany) at ×100 magnifications. Clot area was measured in 10 fields of vision (from 10 angles).

Venous thrombosis model

The animals (rats) were divided into 4 groups of 8 animals. The animals were administered GRS compound in 10 mg/kg dose or rivaroxaban (Xarelto®, 15 mg film-coated tablets, Bayer, Germany, batch BXJB9R1, lot 35457, expiration date 01.05.2022) in median effective dose 5 mg/kg [6]. The third group received the combination of GRS and rivaroxaban in the same doses. Control group rats received carboxymethyl cellulose solution.

Venous thrombosis was induced 1 hour after test article administration by ligating the inferior vena cava below renal veins, also ligating all visible side branches [7]. After 24 hours the clot was extracted from the inferior vena cava, weighed, dried in a dry-air thermostat TS-1/20 SPU (Smolensk SCTB SPU, Russia) to constant mass at 60 °C for 24 hours and then weighed again on laboratory scales (Pioneer 213C Ohaus Corp., USA) to calculate the clot's density.

Data processing

Experimental data was statistically processed using Statistica 8.0 software. The results were presented as means and mean standard deviation (M ± m). Statistical significance level between groups ($p < 0.05$) was calculated using Mann–Whitney U-test as one most acceptable for small sample size [8] and Fisher test.

RESULTS AND DISCUSSION

In arterial thrombosis model control group rats (without treatment) had carotid artery thrombosis in 75 % cases. Carotid artery occlusion was observed in 75 % of animals 60 minutes after modelling and in 50 % of animals after 24 hours. GRS compound, administered orally in 10 mg/kg dose 3 hours before iron chloride administration, has increased mean time until blood flow cessation in the carotid artery by 35 % ($p < 0.05$). Thrombosis in GRS group developed in 28 % of animals, complete carotid artery occlusion in 28 % of animals after 60 min and in 14 % of animals after 24 hours ($p < 0.05$). Blood clot mass did not statistically differ between groups (table 1).

Therefore, the indolinone derivative GRS has considerably reduced the frequency of thrombosis in experimental arterial thrombosis, but did not considerably affect blood clot mass. High efficacy of GRS at the initial thrombosis stage may be associated with its stimulation of soluble guanylate cyclase in endothelial and smooth muscle cells, which prevented endothelial dysfunction, developed a resistance to blood clot formation and induced vasodilation.

Intravenous thrombin administration lead to generalized thrombosis after 1–3 min with thrombosis of mainly pulmonary arteries, killing 9 animals out of 10, which conforms to literature data [9]. After 3 days of oral administration of GRS in 10 mg/kg dose once daily, mortality in the test was 8 animals out of 10, while clopidogrel administration in 10 mg/kg dose has reduced mortality to 3 animals out of 10 ($p < 0.05$). Clopidogrel, as a classic antiplatelet drug and an inhibitor of platelet $P2Y_{12}$ receptors, had potent antithrombotic action. Blood clot area in the lungs in clopidogrel group was 48 % smaller than in the control group ($p < 0.05$).

Time to animal mortality did not differ between GRS and clopidogrel groups ($p > 0.05$) (table 2), likely because this model involves immediate (in several minutes) pulmonary embolism.

In a model of venous thrombosis in rats (table 3), induced by the ligature of inferior vena cava, GRS compound in 10 mg/kg dose has reduced wet blood clot mass by 66 %, while rivaroxaban in 5 mg/kg dose reduced it by 81 % ($p < 0.05$). Dried blood clot mass did not statistically differ between GRS and rivaroxaban group ($p > 0.05$). High efficacy of GRS compound in this deep vein thrombosis model is associated not only with its antiplatelet effects, since it's well known that in antiplatelets are less effective in preventing and treating deep vein thrombosis and pulmonary embolism than anticoagulants [10], but also the anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects of GRS, and with an increase of sGC sensitivity to endogenous nitric oxide [11].

Table 1. Antithrombotic action of an indolinone derivative GRS (10 mg/kg, oral) after single administration in a rat model of arterial thrombosis, induced by iron chloride application (M ± m)

Group ($n = 8$)	Time to blood flow cessation, min	Percentage of rats with complete occlusion		Percentage of rats with blood clot after 24 h	Blood clot mass after 24 h, mg
		60 min	24 h		
Animals with carotid artery thrombosis (control)	20.6 ± 1.4	6 (75)	4 (50)	6 (75)	0.28 ± 0.05
Animals receiving GRS	31.5 ± 1.0*	2 (28)*	1 (14)*	2 (28)*	0.25 ± 0.05

Note. * Statistically significant difference from control animals (Mann–Whitney test), $p < 0.05$.

Table 2. Antithrombotic action of an indolinone derivative GRS (10 mg/kg, oral) after 3-fold administration in a mice model of thromboembolism, induced by intravenous thrombin administration (M ± m)

Parameters	Experimental conditions ($n = 10$)		
	Thrombosis (control)	GRS 10.0 mg/kg	Clopidogrel 10.0 mg/kg
Mortality, %	90	80	30*
Time to death onset, min	2.35 ± 0.27	2.83 ± 0.58	2.72 ± 0.40
Blood clot area, mcm^2	2542 ± 494	2168 ± 260	1225 ± 275#

Note. * Statistically significant difference in mortality (Fisher test), $p < 0.05$; # – statistically significant difference from control animals (Mann–Whitney test), $p < 0.05$.

Table 3. Antithrombotic action of GRS compound (10 mg/kg, oral), rivaroxaban (5 mg/kg, oral) and their combination after single administration in a rat model of venous thrombosis (M ± m)

Experimental conditions	Wet blood clot mass, mg	Dry blood clot mass, mg
Venous thrombosis (control, $n = 5$)	51.3 ± 6.8	13.1 ± 2.1
GRS, 10 mg/kg ($n = 10$)	17.1 ± 3.3*	4.3 ± 0.9*
Rivaroxaban, 5 mg/kg ($n = 10$)	9.6 ± 3.4*#	2.55 ± 0.8*
Combination of GRS and rivaroxaban ($n = 10$)	12.5 ± 3.5*	3.6 ± 0.9*

Note. * Statistically significant difference from control animals (Mann–Whitney test), $p < 0.05$; # – statistically significant difference from GRS group (Mann–Whitney test), $p < 0.05$.

High efficacy of GRS compound in this deep vein thrombosis model is associated not only with its antiplatelet effects, since it's well known that in antiplatelets are less effective in preventing and treating deep vein thrombosis and pulmonary embolism than anticoagulants [10], but also the anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects of GRS, and with an increase of sGC sensitivity to endogenous nitric oxide [11].

Combined administration of 10 mg/kg GRS and 5 mg/kg rivaroxaban did not increase the antithrombotic effect in this model, since GRS as a sGC stimulator inhibits the development of platelet thrombus, while rivaroxaban as a direct Xa factor inhibitor blocks the final stage of coagulation hemostasis.

The obtained data demonstrate the high antithrombotic activity of a new soluble guanylate cyclase stimulator GRS in models of arterial thrombosis, induced by iron chloride application to the carotid artery, and venous thrombosis, induced by the ligature of inferior vena cava. GRS compound had no significant antithrombotic effect in a model of acute thromboembolism induced by intravenous thrombin administration. Thrombin increases platelet and coagulation hemostasis, increasing platelet aggregation and activation with active participation of PAR-1 receptors and, being a proteolytic enzyme, catalyzes fibrin synthesis. Considering the fast and potent effect of thrombin, P2Y12 platelet receptor inhibitor clopidogrel has more potent antithrombotic effects in this model than sGC stimulator GRS.

According to prior studies, antiplatelet action of GRS compound is more pronounced towards increased platelet aggregation in cardiovascular diseases. In addition, GRS improves the function of vascular endothelium. Unlike GRS, clopidogrel irreversibly blocks platelet aggregation and increases the risk of bleeding.

Absence of antithrombotic activity of GRS compound in a model of thrombin-induced acute pulmonary embolism shows that GRS can't serve as a first-line drug in generalized thrombosis or high risk of thromboembolism.

CONCLUSION

The new indolinone derivative GRS has potent antithrombotic action in models of arterial and venous thrombosis in rats, while not preventing pulmonary vessel thrombosis in mice after thrombin administration. Being a stimulator of soluble guanylate cyclase, GRS compound not only inhibits platelet aggregation, but also improves the function of endothelium in cardiovascular pathologies.

REFERENCES

1. Sabouret P., Savage M. P., Fischman D., Costa F. Complexity of antiplatelet therapy in coronary artery disease patients. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2021;21(1):21–34. DOI: 10.1007/s40256-020-00414-0.
2. Bykov V. V., Chernysheva G. A., Smol'yakova V. I., Serebrov V. Yu., Khazanov V. A., Udut V. V. Antiplatelet activity of a new indolinone derivative *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologia*. 2017;82(7):10–13. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-7-10-13.
3. Maksimenko A. V., Tishchenko E. G. Antioxidant biotherapy for vascular wall protection with superoxide dismutase and catalase derivatives. *Tsitologiya*. 1999;41(9):821–822. (In Russ.).
4. Sugidachi A., Ohno K., Jakubowski J. A., Ito Y., Tomizawa A., Mizuno M. Induction of Diabetes Abolishes the Antithrombotic Effect of Clopidogrel in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *TH Open*. 2017;01(02):e92–e100. DOI: 10.1055/s-0037-1605361.
5. Rauzi F., Smyth E., Emerson M. Refinement of Mouse Protocols for the Study of Platelet Thromboembolic Responses *in vivo*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;117(12):2283–2290. DOI: 10.1160/TH17-04-0250.
6. Ewees M. G., Messiha B. A. S., Abo-Saif A. A., Bayoumi A. M. A., Abdel-Bakky M. S. Interference with coagulation cascade as a novel approach to counteract cisplatin-induced acute tubular necrosis; an experimental study in rats. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1155. DOI: 10.3389/fphar.2018.01155.
7. Henke P. K., Varma M. R., Moaveni D. K., Dewyer N. A., Moore A. J., Lynch E. M. Fibrotic injury after experimental deep vein thrombosis is determined by the mechanism of thrombogenesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;98(5):1045–1055. DOI: 10.1160/TH07-03-0190.
8. Mishra P., Pandey C. M., Singh U., Keshri A., Sabaretnam M. Selection of appropriate statistical methods for data analysis. *Annals of Cardiac Anaesthesia*. 2019;22(3):297–301. DOI: 10.4103/aca.ACA_248_18.
9. Gupta A. K., Chopra B. S., Vaid B., Sagar A., Raut S., Badmalia M. D., Ashish, Khatri N. Protective effects of gelsolin in acute pulmonary thromboembolism and thrombosis in the carotid artery of mice. *PLoS One*. 2019:14(4):e0215717. DOI: 10.1371/journal.pone.0215717.
10. Konstantinides S. V. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonaryembolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(8):3848. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3848.
11. Buys E. S., Zimmer D. P., Chickering J., Graul R., Chien Y. T., Profy A., Hadcock J. R., Masferrer J. L., Milne G. T. Discovery and development of next generation sGC stimulators with diverse multidimensional pharmacology and broad therapeutic potential. *Nitric Oxide*. 2018;78:72–80. DOI: 10.1016/j.niox.2018.05.009.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83
УДК 544.165

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия

М. А. Джавахян[1,2], Ю. Э. Прожогина[2], О. К. Павельева[1]✉, Е. И. Каленикова[2]

[1] ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1
[2] ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Павельева Олеся Константиновна. **E-mail:** pavelieva.olesya@yandex.ru

ORCID: М. А. Джавахян – https://orcid.org/0000-0003-2673-6203; Ю. Э. Прожогина – https://orcid.org/0000-0003-4803-5133;
О. К. Павельева – https://orcid.org/0000-0002-2397-8920; Е. И. Каленикова – https://orcid.org/0000-0003-0068-2788.

Статья поступила: 16.11.2021 **Статья принята в печать:** 18.03.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Природные глубокие эвтектические растворители [deep eutectic solvents (DESs)] являются перспективными экстрагентами для многих биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья. Они биодеградируемы, безопасны, стабильны, их производство доступно и легко осуществимо, а эффективность экстракции сопоставима с известными органическими растворителями. В связи с этим интерес к глубоким эвтектическим растворителям неуклонно растет в последние годы, и они находят применение в различных областях – химии, фармацевтике и пищевой промышленности.

Цель. Целью настоящей работы было изучить возможность экстракции флавоноидов из растительного сырья посредством глубоких эвтектических растворителей, а также сопоставить эффективность их экстракции с традиционными растворителями.

Материалы и методы. Экстракцию флавоноидов проводили из сбора растительной композиции, состоящей из травы пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca* L.), травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), травы мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.) и травы тимьяна ползучего (чабреца) (*Thymus serpyllum* L.) в соотношении 4:2,5:2,5:1, измельченных до размера частиц 2–3 мм. В качестве экстрагентов использовались 21 эвтектический растворитель на основе бетаина гидрохлорида и холина битартрата в качестве акцепторов водородной связи.

Результаты и обсуждение. Исследована экстрагирующая способность 21-го экспериментального состава DESs. Изучены влияние содержания воды в составе DES, а также воздействие температуры на процесс экстракции. Количественное определение флавоноидов в пересчете на рутин проводилось методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 410 ± 2 нм. Максимальный выход флавоноидов был достигнут при использовании 40%-го водного раствора DES на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3 при 60 °C.

Заключение. Извлекающая способность полученного DES по эффективности сопоставима и даже незначимо превышает таковую у классического экстрагента для исследуемой композиции – 70%-го этилового спирта. Дальнейшая разработка и оптимизация процесса использования DESs – многообещающее направление развития химии и фармацевтической технологии.

Ключевые слова: глубокие эвтектические растворители (DESs), флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия, пустырник, зверобой, мелисса, чабрец

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

Вклад авторов. М. А. Джавахян придумала и организовала экспериментальное исследование, поэтапный план работы. И. Э. Прожогина разработала технологию получения эвтектического экстракта, провела контроль качества. О. К. Павельева принимала участие в воспроизведении результатов и оформлении статьи. Е. И. Каленикова провела анализ полученных результатов. Все авторы приняли участие в обсуждении результатов и подготовке статьи.

Для цитирования: Джавахян М. А., Прожогина Ю. Э., Павельева О. К., Каленикова Е. И. Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):75–83. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83

Natural Deep Eutectic Solvents as Alternative Flavonoid Extractants from the Sedative Plant Composition

Marina A. Dzhavakhyan[1,2], Yulia E. Prozhogina[2], Olesya K. Pavelieva[1]✉, Elena I. Kalenikova[2]

[1] All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1, Greena str., Moscow, 117216, Russia
[2] Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Olesya. K. Pavelieva. **E-mail:** pavelieva.olesya@yandex.ru

ORCID: Marina A. Dzhavakhyan – https://orcid.org/0000-0003-2673-6203; Yulia E. Prozhogina – https://orcid.org/0000-0003-4803-5133;
Olesya K. Pavelieva – https://orcid.org/0000-0002-2397-8920; Elena I. Kalenikova – https://orcid.org/0000-0003-0068-2788.

Received: 16.11.2021 **Revised:** 18.03.2022 **Published:** 25.08.2022

© Джавахян М. А., Прожогина Ю. Э., Павельева О. К., Каленикова Е. И., 2022
© Dzhavakhyan M. A., Prozhogina Yu. E., Pavelieva O. K., Kalenikova E. I., 2022

Abstract
Introduction. Natural deep eutectic solvents (DESs) are promising extractants for many biologically active substances from plant raw materials. They are biodegradable, safe, stable, their production is affordable and easily feasible, and the extraction efficiency is comparable to known organic solvents. In this regard, interest in deep eutectic solvents has been steadily growing in recent years, and they are being used in various fields of chemistry, pharmaceuticals and the food industry.
Aim. The purpose of this work was to study the possibility of extracting flavonoids from plant raw materials using deep eutectic solvents, as well as to compare the efficiency of their extraction with traditional solvents.
Materials and methods. The extraction of flavonoids was carried out from the collection of a plant composition consisting of the herb of motherwort cordial (common motherwort) (*Leonurus cardiaca* L.), the herb of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), the herb of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and the herb of creeping thyme (thyme) (*Thymus serpyllum* L.) in a ratio of 4:2.5:2.5:1, crushed to a particle size of 2–3 mm. 21 eutectic solvents based on betaine hydrochloride and choline bitartrate as hydrogen bond acceptors were used as extractants.
Results and discussion. The extracting ability of 21 experimental compositions of DESs was studied. The influence of the water content in the composition of DES, as well as the effect of temperature on the extraction process, has been studied. Quantitative determination of flavonoids in terms of rutin was carried out by differential spectrophotometry at a wavelength of 410 ± 2 nm. The maximum yield of flavonoids was achieved using a 40 % aqueous solution of DES based on betaine hydrochloride and propylene glycol in a molar ratio of 1:3 at 60 °C.
Conclusion. The recovery ability of the obtained DES is comparable in efficiency and even slightly exceeds that of the classic extractant for the investigated composition – 70 % ethyl alcohol. Further development and optimization of the process of using DESs is a promising direction for the development of chemistry and pharmaceutical technology.

Keywords: natural deep eutectic solvents (DESs), flavonoids, differential spectrophotometry, leonurus, hypericum, melissa, thyme

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. Marina A. Dzhavakhyan came up with and organized an experimental study, a phased work plan. Yulia E. Prozhogina and developed technologies for obtaining eutectic extract, carried out quality control. Olesya K. Pavelieva participated in the reproduction of the results and the design of the article. Elena I. Kalenikova analyzed the results. All authors took part in the discussion of the results and preparation of the article.

For citation: Dzhavakhyan M. A., Prozhogina Yu. E., Pavelieva O. K., Kalenikova E. I. Natural deep eutectic solvents as alternative flavonoid extractants from the sedative plant composition. *Drug development & registration*. 2022;11(3):75–83. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83

ВВЕДЕНИЕ

Глубокие эвтектические растворители [deep eutectic solvents (DESs)] – современная и перспективная альтернатива использующимся в настоящее время органическим экстрагентом, таким как этанол, метанол, водно-ацетоновые растворы, углеводороды [1]. Последние являются токсичными, взрыво- и пожароопасными, кроме того, наносят урон окружающей среде, так как не способны к биодеградации. Поэтому появилась необходимость в новых, безопасных и в то же время эффективных растворителях, пригодных для использования в фармации и пищевой промышленности. Глубокие эвтектические растворители соответствуют всем вышеприведенным критериям: они биодеградируемы, безопасны [2–5], стабильны, их производство доступно и легко осуществимо, а эффективность экстракции сопоставима с известными органическими сольвентами [6]. В связи с этим интерес к глубоким эвтектическим растворителям неуклонно растет в последние годы [7], и они находят применение в различных областях химии, фармацевтике и пищевой промышленности [8].

Образование глубокого эвтектического растворителя основано на установлении водородных связей, или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, между донором и акцептором водородных связей [9, 10]. В качестве доноров обычно выступают органические кислоты, спирты, сахара, в качестве акцепторов – четвертичные аммониевые соли. Наиболее часто встречающиеся компоненты «зеленых» растворителей приведены в таблице 1. Данные вещества, при комнатной температуре представляющие собой твердые соединения либо вязкие жидкости, при взаимодействии образуют эвтектическую смесь: температура плавления получаемой субстанции оказывается значительно ниже температуры плавления отдельных входящих в ее состав компонентов, в результате чего образуется жидкость надмолекулярной структуры, относящаяся к неводным растворителям. Температура плавления глубокого эвтектического растворителя ниже комнатной, благодаря чему получаемые растворы сохраняют стабильность при хранении в течение долгого времени. Строение, пространственная структура, элементный состав, заряд образующих глубокий эвтектический растворитель молекул влияют на прочность и число возникающих водородных связей, а следовательно, на устойчивость и физико-химические свойства получаемого экстрагента. Процесс экстракции глубокими эвтектическими растворителями основан на замещении молекул растворителя извлекаемыми биологически активными ве-

ществами с разрывом существующих водородных связей и образованием новых, что было доказано методами ядерно-магнитного резонанса при изучении ^{1}H ЯМР-спектров различных глубоких эвтектических растворителей [11]. Несомненным преимуществом является и огромное число комбинаций, из которых можно составить глубокие эвтектические растворители, причем их свойства будут варьировать в зависимости от входящих компонентов. Примечательно, что эффективность экстракции таким «зеленым» сольвентом будет различаться, исходя как из целевого биологически активного компонента, так и из конкретного глубокого эвтектического растворителя. Так, для фенольных соединений эффективное и полное извлечение из растительного сырья может достигаться одним растворителем, для флавоноидов – совершенно другим по составу «зеленым» экстрагентом. Подбирая определенные комбинации и соотношения компонентов глубоких эвтектических растворителей, изменяя их вязкость и текучесть, разбавляя другими сольвентами, в частности водой, можно изменять выход и характеристики получаемых извлечений. В литературе уже описаны способы экстракции из растительного материала флоротанинов [12], рутина [13], кверцетина и мирицетина [14] и других БАВ. В нашей работе описан способ экстракции флавоноидов из седативной растительной композиции с использованием DESs.

Таблица 1. Доноры и акцепторы водородных связей, наиболее часто образующие глубокие эвтектические растворители

Table 1. Donors and acceptors of hydrogen bonds, most often forming natural deep eutectic solvents

Акцепторы водородных связей Donors of hydrogen bonds	Доноры водородных связей Acceptors of hydrogen bonds
Холина хлорид Choline chloride	Яблочная кислота Malic acid
Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid
Ацетилхолина хлорид Acetylcholine chloride	Щавелевая кислота Oxalic acid
Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Лимонная кислота Citric acid
L-Пролин L-Proline	Глюкоза Glucose
L-Аланин L-Alanine	Глицерин Glycerol
L-Гистидин L- Histidine	Пропиленгликоль Propylene glycol

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Экстракцию флавоноидов проводили из сбора растительной композиции, состоящей из травы пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca* L.), травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), травы мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.) и травы тимьяна ползучего (чабреца) (*Thymus serpyllum* L.) в соотношении 4:2,5:2,5:1, измельченных до размера частиц 2–3 мм. Лекарственные растения были доставлены из Северо-Кавказского филиала Ботанического сада Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Данный сбор обладает седативными свойствами благодаря содержанию комплекса биологически активных веществ, содержащего в том числе и флавоноиды [15], основным из которых является рутин, что было доказано валидированными методами.

Материалы и реагенты

Холина битартрат (Mw = 253,25) и бетаина гидрохлорид (Mw = 153,61) получены из Suzhou Vitajoy Biotech Co. (Китай), яблочная кислота (Mw = 134,1) доставлена из Anhui Sealong Biotechnology (Китай), молочная кислота (Mw = 90,08), лимонная кислота (Mw = 192,1), щавелевая кислота (Mw = 90,04), глюкоза (Mw = 180,16), пропиленгликоль (Mw = 76,09), глицерин (Mw = 92,09) и порошок рутина (≥94.0 %) предоставлены компанией Sigma Aldrich (Китай), алюминия хлорид (PanReac AppliChem, Испания), спирт этиловый 96 % (ООО «Константа-Фарм М», Россия), кислота уксусная ледяная (ООО ТД «АльфаХим», Россия).

Изготовление глубоких эвтектических растворителей

Для изготовления различных комбинаций глубоких эвтектических растворителей был использован тепловой метод. Компоненты смешивали в определенных мольных соотношениях в стеклянной конической колбе, закрывали пробкой и нагревали при 60 °C на водяной бане до образования однородной прозрачной жидкости (60–90 мин), устойчивой и стабильной при комнатной температуре.

В данном эксперименте нами получен 21 глубокий эвтектический растворитель. Их описание и состав приведены в таблице 2. Изготовленные DESs представляют собой вязкие прозрачные жидкости.

Экстракция флавоноидов из сбора растительной композиции

В качестве объекта исследования использована экспериментальная растительная композиция, обладающая седативным действием [15].

Около 2 г (точная навеска) исследуемого сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл полученного глубокого эвтектического растворителя, колбу закрывали пробкой. Затем колбу нагревали при температуре 60 °C в течение 1 ч, содержимое перемешивали с помощью магнитной мешалки. Колбу охлаждали до комнатной температуры, содержимое колбы фильтровали через бумажный складчатый фильтр (синяя лента) для дальнейшего анализа.

Таблица 2. Состав глубоких эвтектических растворителей

Table 2. Deep eutectic solvents compositions

Название Extractant	Компонент Component			Мольное соотношение Molar ratio
	1	2	3	
DES 1	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Молочная кислота Lactic acid	Вода Water	1:1:2
DES 2	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Щавелевая кислота Oxalic acid	Вода Water	1:1:1
DES 2	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Щавелевая кислота Oxalic acid	Вода Water	1:1:2
DES 4	Холина битартрат Choline bitartrate	Лимонная кислота Citric acid	Вода Water	1:1:2
DES 5	Холина битартрат Choline bitartrate	Лимонная кислота Citric acid	Вода Water	1:1:1
DES 6	Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid	Вода Water	1:1:2
DES 7	Холина битартрат Choline bitartrate	Глюкоза Glucose	Вода Water	5:2:5
DES 8	Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid	ПЭГ-400 PEG-400	1:1:0,5
DES 9	Холина битартрат Choline bitartrate	Лимонная кислота Citric acid	ПЭГ-400 PEG-400	1:1:0,5
DES 10	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	1:1:1
DES 11	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	2:1:1
DES 12	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	1:1:2
DES 13	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Молочная кислота Lactic acid	–	1:1
DES 14	Холина битартрат Choline bitartrate	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	1:1:1
DES 15	Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid	–	1:1
DES 16	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Глюкоза Glucose	Вода Water	5:2:5
DES 17	Холина битартрат Choline bitartrate	Яблочная кислота Malic acid	Пропиленгликоль Propylene glycol	1:1:3
DES 18	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Глицерин Glycerol	1:1:3
DES 19	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Пропиленгликоль Propylene glycol	1:1:3
DES 20	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Пропиленгликоль Propylene glycol	–	1:3
DES 21	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Глицерин Glycerol	–	1:3

Оптимизация процесса экстрагирования

Все экстракты на основе DESs были получены в одинаковых условиях: соотношение сырье : экстрагент – 1:15 г/мл, время экстракции 1 ч, температура экстракции 60 °C. Для первоначального скрининга экспериментальных образцов DESs, представленных в таблице 2, изготовлены их 50%-е водные растворы (m/m). Усовершенствование процесса экстрагирования осуществлялось после выбора оптимального DES по параметрам содержания воды в растворе DES (30, 40, 50, 60 и 70 %) и температуры экстракции (50, 60, 70, 80 °C).

Количественное определение

Для оценки суммарного содержания флавоноидов в полученных извлечениях был использован метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования флавоноидов с ионами трехвалентных металлов – Al, Zr, Ga и др., и обладающий большей селективностью по сравнению с прямым спектрофотометрическим методом [16, 17]. В результате реакции комплексообразования с алюминия хлоридом происходит батохромный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 нм до 390–410 нм, что позволяет количественно

обнаружить искомые действующие вещества по оптической плотности растворов в этой области спектра.

При добавлении 5%-го раствора хлорида алюминия в 70%-ом этиловом спирте к раствору изучаемого извлечения в его спектре наблюдается максимум поглощения, который совпадает с максимумом поглощения раствора рутина с хлоридом алюминия. Это определило выбор длины волны 410 ± 2 нм как характеристической для количественного определения содержания флавоноидов в полученных с помощью глубоких эвтектических растворителей экстрактах.

Измерения проводились на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Статистический анализ

Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистическую обработку осуществляли с использованием программного пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состава DES на процесс экстракции флавоноидов

Эффективность DESs для извлечения флавоноидов была доказана ранее проводимыми исследованиями [18–22]. Нами изготовлен и протестирован 21 глубокий эвтектический растворитель на предмет эффективности экстракции флавоноидов из растительного сбора на основе травы пустырника, травы зверобоя, травы мелиссы и травы чабреца. Эффективность процесса извлечения БАВ изучена в сравнении с экстрактами, полученными на основе 70%-го спирта этилового, 96%-го спирта этилового и воды как наиболее часто применяемых экстрагентов для флавоноидов. Вязкость изготовленных DESs снижена их разбавлением 50 % воды (m/m). В качестве акцептора протона выступали холина битартрат или бетаина гидрохлорид, в качестве донора – органические кислоты, спирты и сахара.

Данные по извлечению флавоноидов из сбора растительной композиции приведены на рисунке 1 и отображены в таблице 3.

Таблица 3. **Влияние состава DES на выход флавоноидов**

Table 3. **Effect of DES composition on flavonoid yield**

Экстрагент Extractant	Выход флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г) Extraction yields of the target compounds (mg/g)	Экстрагент Extractant	Выход флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г) Extraction yields of the target compounds (mg/g)
DES-1	3,67 ± 0,15	DES-13	3,68 ± 0,37
DES-2	0,94 ± 0,08	DES-14	3,73 ± 0,21
DES-3	0,94 ± 0,21	DES-15	3,68 ± 0,33
DES-4	4,15 ± 0,35	DES-16	1,01 ± 0,26
DES-5	4,39 ± 0,27	DES-17	6,19 ± 0,35
DES-6	3,56 ± 0,16	DES-18	6,63 ± 0,03
DES-7	0,33 ± 0,17	DES-19	6,70 ± 0,20
DES-8	5,73 ± 0,03	DES-20	9,48 ± 0,23
DES-9	4,51 ± 0,25	DES-21	8,67 ± 0,33
DES-10	5,53 ± 0,53	Этанол 70 % Ethanol 70 %	9,70 ± 0,10
DES-11	4,35 ± 0,09	Этанол 96 % Ethanol 96 %	7,10 ± 0,46
DES-12	5,08 ± 0,42	Вода Water	3,50 ± 0,24

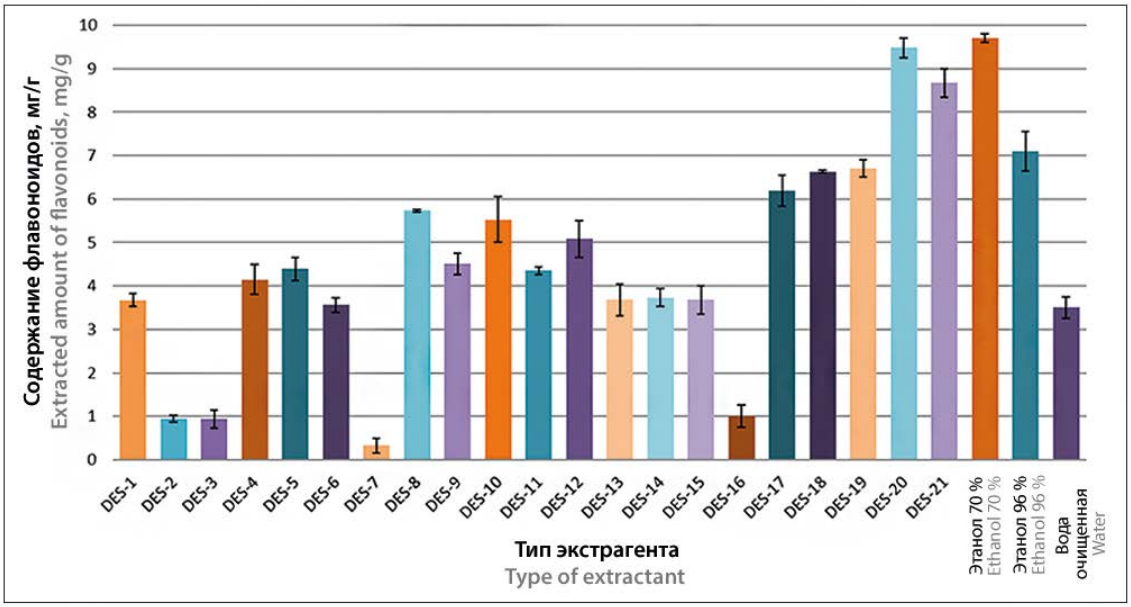


Рисунок 1. **Содержание флавоноидов (мг/г) в экстрактах из растительного сбора на основе 50%-х водных растворов DESs (m/m)**

Figure 1. **Flavonoid content (mg/g) in extracts from the plant composition based on 50 % aqueous solutions of DESs (m/m)**

Как видно из рисунка, способность DES к извлечению флавоноидов зависит от состава конкретного экстрагента. Для DESs, основу которых составлял холина битартрат как акцептор протона, извлекающая способность оказалась в целом ниже, чем для DESs на основе бетаина гидрохлорида. Возможно, это обусловлено особенностью возникновения водородных связей между компонентами DES. Хлорид-анион – более сильный акцептор протонов, чем ион битартрата. Доказано, что флавоноиды конкурируют с донорами протонов в составе DES за образование водородных связей [23]. Чем больше образуется водородных связей в структуре DES, тем большее количество флавоноидов может взаимодействовать с компонентами растворителя и извлекаться из растительного материала. Кроме того, больший размер аниона битартрата по сравнению с хлорид-ионом может способствовать возникновению стерических препятствий к образованию водородных связей.

Важное значение играет и тип донора протонов. Целевые экстрагируемые соединения – флавоноиды, обладающие слабыми кислотными свойствами за счет свободных фенольных гидроксильных групп и поэтому хорошо растворимые в растворах щелочей. DESs, базирующиеся на органических кислотах как донорах протона, имеют более кислую среду [24] и поэтому хуже извлекают флавоноиды, чем DESs, включающие спирты в качестве доноров протонов. Этот эффект доказывает тот факт, что именно DESs на основе полиолов и гликолей (ПЭГ-400, глицерина, пропиленгликоля) обладают наилучшей экстрагирующей способностью. Кроме того, по-видимому, образуемые органическими кислотами водородные связи более устойчивы, и экстрагируемым флавоноидам труднее заменить их в составе растворителя, т. е. энтальпия сольватации полиолов в составе DESs более экзотермична и выгодна для извлечения целевых соединений их растительного материала [25].

Таким образом, оптимальным экстрагентом для извлечения флавоноидов из растительной композиции является DES-20 на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3. С помощью данного экстрагента удалось извлечь 9,48 ± 0,02 мг/г сухого сырья флавоноидов в пересчете на рутин, что составляет 97,7 % от количественного содержания флавоноидов в водно-этанольном (70 %) экстракте, взятом в качестве стандарта.

Влияние содержания воды в составе DES на процесс экстракции флавоноидов

Далее нами изучен эффект содержания воды в составе DES на его экстрагирующую способность. Получены DESs на основе бетаина гидрохлорида – пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3 (DES-20), содержащие 30, 40, 50, 60 и 70 % воды (m/m), которые использовали в качестве экстрагентов флавоноидов из растительного сбора. Экстракция осуществлялась при температуре 60 °C в течение 1 ч при соотношении сырье:экстрагент – 1:15 г/мл. Выход флавоноидов из растительного материала в зависимости от концентрации DES графически представлен на рисунке 2.

Как видно из рисунка, с разбавлением DES экстрагирующая способность растворителя сначала увеличивается, что может быть вызвано повышением полярности растворителя, а также уменьшением его вязкости. Это облегчает процесс диффузии согласно уравнению Стокса – Эйнштейна [26]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R},$$

где D – коэффициент диффузии; k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; η –вязкость среды; R – гидродинамический радиус молекулы.

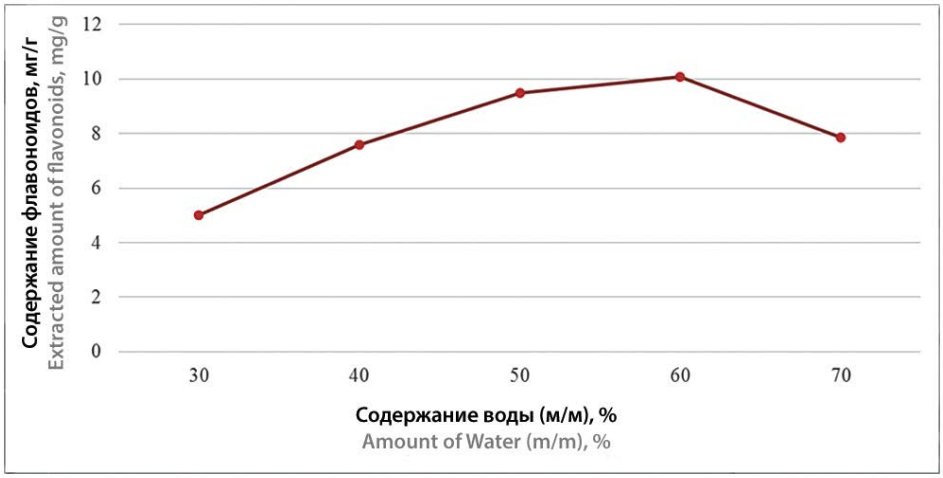


Рисунок 2. Содержание флавоноидов (мг/г) в экстрактах из растительного сбора на основе водных растворов DES-20 с различным содержанием воды

Figure 2. Flavonoid content (mg/g) in extracts from plant composition based on aqueous solutions of DES-20 with different water content

Однако после определенного значения дальнейшее увеличение содержания воды приводит к уменьшению выхода флавоноидов из растительного сырья, что можно объяснить разрывом существующих водородных связей и нарушением надмолекулярной структуры DES.

Таким образом, было установлено, что оптимальное содержание воды в DES на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля (мольное соотношение 1:3) составляет 60 %.

Влияние температуры на процесс экстракции флавоноидов

Чтобы определить оптимальную температуру экстракции, была осуществлена экстракция флавоноидов из сбора растительной композиции при температурах 50, 60, 70 и 80 °C. Эффект, оказываемый температурой на извлечение БАВ, представлен на рисунке 3.

Повышение температуры экстракции, с одной стороны, ведет к увеличению скорости диффузии, но, с другой стороны, приводит к разрушению флавоноидов как термолабильных соединений [27].

Экстракцию флавоноидов из растительного сбора проводили с помощью 40%-го раствора DES-20 на основе бетаина гидрохлорида – пропиленгликоля (мольное соотношение 1:3) при температурах 50, 60, 70 и 80 °C в течение 1 ч. На основании полученных экспериментальных данных было установлено, что оптимальная температура, позволяющая извлечь из сырья и сохранить наибольшее количество флавоноидов, составляет 60 °C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования из природных, безопасных и доступных веществ нами изготовлен и изучен на предмет экстрагирующей способности 21 глубокий эвтектический растворитель. Наилучшим экстрагентом для флавоноидов из сбора растительной композиции, состоящей из травы пустырника, травы зверобоя, травы мелиссы и травы чабреца, оказался DES на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3. Оптимизация условий процесса, а именно экстракция 40%-м раствором DES-20 при температуре 60 °C, позволила добиться увеличения выхода флавоноидов из растительного сырья: количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило 10,09 мг/г сухого сырья, что сопоставимо и даже незначимо превышает выход флавоноидов при классическом методе экстракции 70%-м этиловым спиртом (9,7 мг/г сухого сырья). Таким образом, можно прийти к заключению, что новый, экологичный и безопасный способ экстракции БАВ из растительного материала перспективен и может являться достойной альтернативой классическим методам экстракции органическими растворителями. Дальнейшая разработка и оптимизация процесса использования DESs – многообещающее направление развития химии и фармацевтической технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turkmen N., Sari F., Velioglu Y. S. Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chem.* 2006;99:835–841. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.034.
2. Hayyan M., Hashim M. A., Hayyan A., Al-Saadi M. A., Alnashef I. M., Mirghani M. E. et al. Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere.* 2006;90(7):2193–2195. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.004.
3. Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. Natural deep eutectic solvents solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014;2(5):1063–1071. DOI: 10.1021/sc500096j.
4. Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srcek V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Radojčić Redovniković I. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep

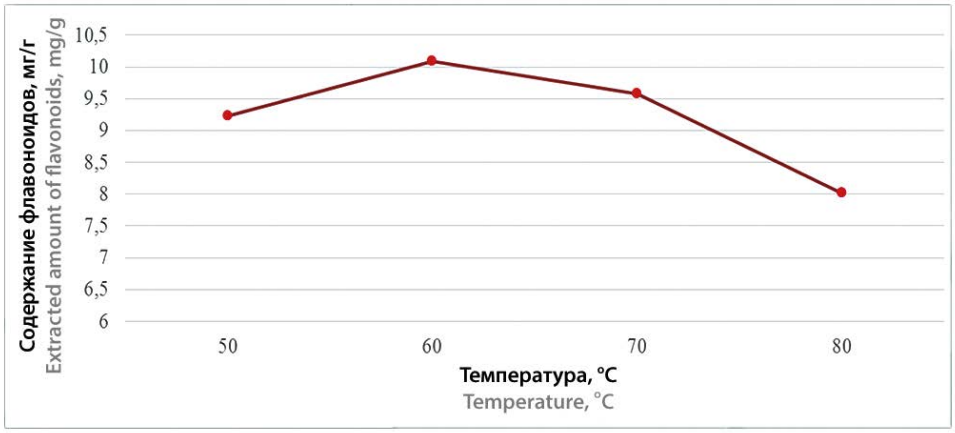


Рисунок 3. Содержание флавоноидов (мг/г) в экстрактах из растительного сбора на основе 40 % водного раствора DES-20, полученных при различных температурах

Figure 3. Flavonoid content (mg/g) in extracts from plant collection based on 40 % aqueous solution of DES-20 obtained at different temperatures

eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015;112:46–53. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
5. Wen Q., Chen J. X., Tang Y. L., Wang J., Yang Z. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere.* 2015;132:63–69. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.061.
6. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* 2013;766:61–68. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
7. Andrew C., Etim E. E., Ushie O. A., Job J. N. Deep eutectic solvents: an overview of its application as a "green" extractant. *IJARCS.* 2017;4(6):23–30. DOI: 10.20431/2349-0403.0406003.
8. Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem. Rev.* 2014;114(21):11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
9. Zhao B.-Y., Xu P., Yang F.-X., Wu H., Zong M.-H., Lou W.-Y. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from Sophora japonica. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2015;3(11):2746–2755. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00619.
10. Tang W., Li G., Chen B., Zhu T., Row K. H. Evaluating ternary deep eutectic solvents as novel media for extraction of flavonoids from Ginkgo biloba. *Sep. Sci. Technol.* 2016;52(1):91–99. DOI: 10.1080/01496395.2016.1247864.
11. Obluchinskaya E. D., Daurtseva A. V., Pozharitskaya O. N., Flisyuk E. V., Shikov A. N. Natural deep eutectic solvents as alternatives for extracting phlorotannins from brown algae. *Pharm. Chem. J.* 2019;53(3):243–247. DOI: 10.1007/s11094-019-01987-0.
12. Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* 2003;70–71. DOI: 10.1039/b210714g.
13. Mele A., Tran C. D., De Paoli Lacerda S. H. The structure of a room-temperature ionic liquid with and without trace amounts of water: the role of C–H···O and C–H···F interactions in 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Angew. Chem. Int. edit.* 2003;115(36):4500–4502. DOI: 10.1002/ange.200351783.
14. Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. edit.* 2013;52(11):3074–3085. DOI: 10.1002/anie.201207548.
15. Токарева М. Г., Прожогина Ю. Е., Каленикова Е. И., Джавахян М. А. Фармакогностические и фармакологические аспекты создания новых седативных препаратов на основе лекарственного растительного сырья. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2018;21(3):3–11. DOI: 10.29296/25877313-2018-03-01.
16. Tursymatova O. I., Dilmakhanova M. M. Flavonoid physicochemical properties. *Science and world.* 2015;5(21):30–31.
17. Бабаджанян А. А., Кайшева Н. А., Умняхина И. В. Применение фотометрических методов в анализе растительных лекарственных средств. *Беликовские чтения: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции.* 2015. 17–18 с.
18. Shang X., Tan J.-N., Du Y., Liu X., Zhang Z. Environmentally-friendly extraction of flavonoids from Cyclocarya paliurus (Batal.) iljinskaja leaves with deep eutectic solvents and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules.* 2018;23(9):2110. DOI: 10.3390/molecules23092110.
19. Dai Y., Row K. H. Application of natural deep eutectic solvents in the extraction of quercetin from vegetables. *Molecules.* 2019;24(12):2300. DOI: 10.3390/molecules24122300.
20. Bajkacz S., Adamek J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Anal. Methods.* 2017;11:1330–1344. DOI: 10.1007/s12161-017-1118-5.
21. Peng F., Zhao Y., Li F.-Z., Zong M.-H., Lou W.-Y. The effect of deep eutectic solvents on the asymmetric hydrolysis of styrene oxide by mung bean epoxide hydrolases. *Bioresources and Bioprocessing.* 2018;5:5. DOI: 10.1186/s40643-018-0191-y.
22. Huang Y., Feng F., Jiang J., Qiao Y., Wu T., Voglmeir J., Chen Z.-G. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* 2017;221:1400–1405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.013.
23. Mulia K., Muhammad F., Krisanti E. Extraction of vitexin from binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) leaves using betaine - 1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES). *AIP Conf. Proc.* 2017;1823. DOI: 10.1063/1.4978091.
24. Bi W., Tian M., Row K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A.* 2013;1285:22–30. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.02.041.
25. Abbott A. P., Al-Murshedi A. Y. M., Alshammari O. A. O. Thermodynamics of phase transfer for polar molecules from alkanes to deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibr.* 2017;448:99–104. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.05.008.
26. Świergiel J., Bouteiller L., Jadżyn J. Compliance of the Stokes–Einstein model and breakdown of the Stokes–Einstein–Debye model for a urea-based supramolecular polymer of high viscosity. *Soft. Matter.* 2014;10:8457–8463. DOI: 10.1039/c4sm01556h.
27. Dietrych-Szostak D., Oleszek W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Möench) grain. *J. Agric. Food Chem.* 1999:47(10):4384–4387. DOI: 10.1021/jf990121m.

REFERENCES

1. Turkmen N., Sari F., Velioglu Y. S. Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chem.* 2006;99:835–841. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.034.
2. Hayyan M., Hashim M. A., Hayyan A., Al-Saadi M. A., Alnashef I. M., Mirghani M. E. et al. Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere.* 2006;90(7):2193–2195. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.004.
3. Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. Natural deep eutectic solvents solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014;2(5):1063–1071. DOI: 10.1021/sc500096j.
4. Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srcek V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Radojčić Redovniković I. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015;112:46–53. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
5. Wen Q., Chen J. X., Tang Y. L., Wang J., Yang Z. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere.* 2015;132:63–69. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.061.
6. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* 2013;766:61–68. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
7. Andrew C., Etim E. E., Ushie O. A., Job J. N. Deep eutectic solvents: an overview of its application as a "green" extractant. *IJARCS.* 2017;4(6):23–30. DOI: 10.20431/2349-0403.0406003.
8. Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem. Rev.* 2014;114(21):11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
9. Zhao B.-Y., Xu P., Yang F.-X., Wu H., Zong M.-H., Lou W.-Y. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from Sophora japonica. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2015;3(11):2746–2755. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00619.
10. Tang W., Li G., Chen B., Zhu T., Row K. H. Evaluating ternary deep eutectic solvents as novel media for extraction of flavonoids from Ginkgo biloba. *Sep. Sci. Technol.* 2016;52(1):91–99. DOI: 10.1080/01496395.2016.1247864.
11. Obluchinskaya E. D., Daurtseva A. V., Pozharitskaya O. N., Flisyuk E. V., Shikov A. N. Natural deep eutectic solvents as alternatives for extracting phlorotannins from brown algae. *Pharm. Chem. J.* 2019;53(3):243–247. DOI: 10.1007/s11094-019-01987-0.

12. Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun*. 2003;70–71. DOI: 10.1039/b210714g.
13. Mele A., Tran C. D., De Paoli Lacerda S. H. The structure of a room-temperature ionic liquid with and without trace amounts of water: the role of C–H···O and C–H···F interactions in 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Angew. Chem. Int. edit.* 2003;115(36):4500–4502. DOI: 10.1002/ange.200351783.
14. Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. edit*. 2013;52(11):3074–3085. DOI: 10.1002/anie.201207548.
15. Tokareva M. G., Prozhogina Y. E., Kalenikova E. I., Dzhavakhyan M. A. The pharmacognostic and pharmacological aspects of the creating of the new sedative drugs based on medicinal plant raw materials. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2018;21(3):3–11. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2018-03-01.
16. Tursymatova O. I., Dilmakhanova M. M. Flavonoid physicochemical properties. *Science and world*. 2015;5(21):30–31.
17. Babadzhanyan A. A., Kaisheva N. A., Umnyakhina I. V. Application of photometric methods in the analysis of plant medicines. *Belikov readings: materials of the IV All-Russian scientific and practical conference*. 2015. 17–18 p. (In Russ.)
18. Shang X., Tan J.-N., Du Y., Liu X., Zhang Z. Environmentally-friendly extraction of flavonoids from Cyclocarya paliurus (Batal.) iljinskaja leaves with deep eutectic solvents and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules*. 2018;23(9):2110. DOI: 10.3390/molecules23092110.
19. Dai Y., Row K. H. Application of natural deep eutectic solvents in the extraction of quercetin from vegetables. *Molecules*. 2019;24(12):2300. DOI: 10.3390/molecules24122300.
20. Bajkacz S., Adamek J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Anal. Methods*. 2017;11:1330–1344. DOI: 10.1007/s12161-017-1118-5.
21. Peng F., Zhao Y., Li F.-Z., Zong M.-H., Lou W.-Y. The effect of deep eutectic solvents on the asymmetric hydrolysis of styrene oxide by mung bean epoxide hydrolases. *Bioresources and Bioprocessing*. 2018;5:5. DOI: 10.1186/s40643-018-0191-y.
22. Huang Y., Feng F., Jiang J., Qiao Y., Wu T., Voglmeir J., Chen Z.-G. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem*. 2017;221:1400–1405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.013.
23. Mulia K., Muhammad F., Krisanti E. Extraction of vitexin from binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) leaves using betaine - 1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES). *AIP Conf. Proc*. 2017;1823. DOI: 10.1063/1.4978091.
24. Bi W., Tian M., Row K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A*. 2013;1285:22–30. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.02.041.
25. Abbott A. P., Al-Murshedi A. Y. M., Alshammari O. A. O. Thermodynamics of phase transfer for polar molecules from alkanes to deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibr*. 2017;448:99–104. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.05.008.
26. Świergiel J., Bouteiller L., Jadżyn J. Compliance of the Stokes–Einstein model and breakdown of the Stokes–Einstein–Debye model for a urea-based supramolecular polymer of high viscosity. *Soft. Matter*. 2014;10:8457–8463. DOI: 10.1039/c4sm01556h.
27. Dietrych-Szostak D., Oleszek W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Möench) grain. *J. Agric. Food Chem*. 1999:47(10):4384–4387. DOI: 10.1021/jf990121m.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-84-89
УДК 615.011.4

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение влияния технологических методов на растворение рентгеноаморфной системы эфавиренз-мезопористый носитель

С. А. Золотов[1], Н. Б. Демина[2], Е. С. Пономарев[1]✉, И. А. Даин[1], А. С. Золотова[1]

[1] ООО «АМЕДАРТ», 109316, Россия, г. Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корп. 24
[2] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

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

ORCID: С. А. Золотов – https://orcid.org/0000-0002-1852-7615; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Е. С. Пономарев – https://orcid.org/0000-0003-2538-5544; И. А. Даин – https://orcid.org/0000-0002-8101-0758; А. С. Золотова – https://orcid.org/0000-0003-2854-1653.

Статья поступила: 10.01.2022 **Статья принята в печать:** 10.03.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Низкая растворимость фармацевтических субстанций (ФС) в физиологическом диапазоне pH желудочно-кишечного тракта может отрицательно повлиять на их всасывание и биодоступность. В последние десятилетия были предложены различные способы повышения растворимости субстанций: получение твердых дисперсий, микронизация, солюбилизация и другие, в том числе методы, основанные на переводе субстанций из кристаллического состояния в аморфное. К последним относятся: распылительная сушка, экструзия горячего расплава, абсорбция на мезопористых носителях, таких как магния алюмосиликат, кремния диоксид и прочие.

Цель. Изучение влияния технологических методов аморфизации путем абсорбции на мезопористых носителях практически нерастворимой ФС эфавиренза на растворение при физиологических значениях температуры и pH.

Материалы и методы. Эфавиренз форма I (EFA) (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010520). Эфавиренз стандартный образец (USP № R09740). Мезопористые носители (МН): кремния диоксид марок – Syloid® 244FP (244), Syloid® XDP 3150 (3150) (W. R. Grace & Co.-Conn, США); FujiSil™ (FSL) (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., Япония); Aeroperl® 300 (APL) (Evonik, Германия); Parteck® SLC (SLC) (Merck Millipore, США); синтетический магния алюмосиликат – Neusilin® US2 (US2), Neusilin® UFL (UFL) (Fuji Chemical Industry Co., Ltd., Япония). Абсорбцию ФС на МН осуществляли методами испарения органического растворителя и методом экструзии горячего расплава.

Результаты и обсуждение. Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что растворение увеличивается в ряду МН SLC > FSL > UFL = US2 > 244 = 3150, что согласуется с увеличением поверхности и уменьшением размеров пор МН. С этим так же согласуется кристаллическое состояние системы ФС эфавиренз-Aeroperl® за счет самого крупного размера пор. При сравнении методов получения рентгеноаморфных систем ФС эфавиренз-МН, очевидно, что метод удаления растворителя дает более высокие результаты по сравнению с технологией экструзии горячего расплава.

Заключение. Для увеличения растворения практически нерастворимых фармацевтических субстанций рекомендуется использовать технологию удаления растворителя, а так же такие мезопористые носители, как кремния диоксид Parteck® SLC или синтетический магния алюмосиликат Neusilin® US2.

Ключевые слова: эфавиренз, мезопористые носители, аморфизация, растворение, метод удаления растворителя, экструзия горячего расплава

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

Вклад авторов. С. А. Золотов и Н. Б. Демина придумали и разработали эксперимент. С. А. Золотов, Е. С. Пономарев и И. А. Даин синтезировали образцы. Е. С. Пономарев и И. А. Даин исследовали образцы с использованием рентгеновской порошковой дифрактометрии. А. С. Золотова провела исследования методом ПЭМ. И. А. Даин и А. С. Золотова провели тест растворение образцов. С. А. Золотов и Е. С. Пономарев участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Золотов С. А., Демина Н. Б., Пономарев Е. С., Даин И. А., Золотова А. С. Изучение влияния технологических методов на растворение рентгеноаморфной системы эфавиренз-мезопористый носитель. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):84–89. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-84-89

Study of the Technological Methods Effect on Dissolution of the X-ray Amorphous Efavirenz-mesoporous Carrier System

Sergey A. Zolotov[1], Natalia B. Demina[2], Evgenii S. Ponomarev[1]✉, Igor A. Dain[1], Anna S. Zolotova[1]

[1] LLC "AMEDART", 42/24, Volgogradskiy avenue, Moscow, 109316, Russia
[2] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgenii S. Ponomarev. **E-mail:** eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: Sergey A. Zolotov – https://orcid.org/0000-0002-1852-7615; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Evgenii S. Ponomarev – https://orcid.org/0000-0003-2538-5544; Igor A. Dain – https://orcid.org/0000-0002-8101-0758; Anna S. Zolotova – https://orcid.org/0000-0003-2854-1653.

Received: 10.01.2022 **Revised:** 10.03.2022 **Published:** 25.08.2022

© Золотов С. А., Демина Н. Б., Пономарев Е. С., Даин И. А., Золотова А. С., 2022
© Zolotov S. A., Demina N. B., Ponomarev E. S., Dain I. A., Zolotova A. S., 2022

Abstract

Introduction. The low solubility of active pharmaceutical ingredients (APIs) in the physiological pH range of the intestinal tract can adversely affect their absorption and bioavailability. Various methods of increasing the solubility of APIs have been proposed in recent decades. Among them there are preparation of solid dispersions, micronization, solubilization and other methods, including ones based on the amorphization of the crystalline substances, such as, spray drying, hot melt extrusion, absorption on mesoporous carriers such as magnesium aluminosilicate, silica, etc.

Aim. Study the technological methods effect on dissolution at physiological temperature and pH range of practically insoluble API efavirenz amorphized by absorption on mesoporous carriers.

Materials and methods. Efavirenz form I (EFA) (LLC "AMEDART", Russia, batch 010520). Efavirenz reference standard (USP № R09740). Mesoporous carriers (MC): Silica – Syloid® 244FP (244), Syloid® XDP 3150 (3150) (W.R. Grace&Co.-Conn, USA); FujiSil™ (FSL) (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., Japan); Aeroperl® 300 (APL) (Evonik, Germany); Parteck® SLC (SLC) (Merck Millipore, USA); Synthetic magnesium aluminometasilicate – Neusilin® US2 (US2), Neusilin® UFL (UFL) (Fuji Chemical Industry Co., Ltd., Japan). The API absorption on MC was performed via solvent wetting and hot melt extrusion methods.

Results and discussion. The dissolution increases in the MC series as the following: SLC > FSL > UFL = US2 > 244 = 3150. The data are consistent with an increase in the surface area and a decrease in the pore size of MC. The crystalline state of the system API efavirenz-Aeroperl® is caused by the largest pore size. It is obvious according to the data that the solvent wetting method gives better results in comparison with the hot melt extrusion as the method of obtaining X-ray amorphous systems API efavirenz-MC.

Conclusion. Solvent wetting technology is recommended for increasing the dissolution of practically insoluble APIs. The preferable mesoporous carriers are silica Parteck® SLC or synthetic magnesium aluminometasilicate Neusilin® US2.

Keywords: efavirenz, mesoporous carriers, amorphization, dissolution, solvent wetting, hot melt extrusion

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

Contribution of the authors. Sergey A. Zolotov and Natalia B. Demina invented and developed the experiment. Sergey A. Zolotov, Evgenii S. Ponomarev and Igor A. Dain synthesized the samples. Evgenii S. Ponomarev and Igor A. Dain studied the samples using X-ray powder diffractometry. Anna S. Zolotova conducted research using the TEM method. Igor A. Dain and Anna S. Zolotova conducted a dissolution test of the samples. Sergey A. Zolotov and Evgenii S. Ponomarev participated in data processing. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Zolotov S. A., Demina N. B., Ponomarev E. S., Dain I. A., Zolotova A. S. Study of the technological methods effect on dissolution of the X-ray amorphous efavirenz-mesoporous carrier system. *Drug development & registration*. 2022;11(3):84–89. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-84-89

ВВЕДЕНИЕ

Низкая растворимость фармацевтических субстанций (ФС) в физиологическом диапазоне pH желудочно-кишечного тракта может отрицательно повлиять на их всасывание и биодоступность. Поэтому исследования, посвященные разработке технологий повышения растворимости гидрофобных субстанций, особенно актуальны [1–5]. В последние десятилетия учеными предложены различные способы повышения растворимости субстанций, такие как, например, получение твердых дисперсий, микронизация, солюбилизация и другие. Ряд технологий направлен на перевод субстанций из кристаллического состояния в аморфное, в результате чего удельная поверхность частиц увеличивается, а кривизна конкретной поверхности дестабилизирует кристалл и эффективно повышает растворимость вещества [6]. К числу таких методов относятся: распылительная сушка [1], экструзия горячего расплава [4], абсорбция на мезопористых носителях (АМН) [3], таких как магния алюмосиликат, кремния диоксид и прочие.

Целью работы является изучение влияния технологических методов аморфизации путем абсорбции на мезопористых носителях практически нерастворимой ФС эфавиренза (полиморфная форма I) на растворение при физиологических значениях температуры и pH.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили:

- эфавиренз форма I (EFA) (ООО «АМЕДАРТ», Россия, серия 010520);
- эфавиренз стандартный образец (USP № R09740);

Структурная формула ФС эфавиренза представлена на рисунке 1.

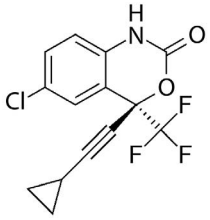


Рисунок 1. Структурная формула эфавиренза

Figure 1. Efavirenz chemical structure

Мезопористые носители (МН):

- кремния диоксид марок – Syloid® 244FP (244), Syloid® XDP 3150 (3150) (W. R. Grace & Co.-Conn, США); FujiSil™ (FSL) (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., Япония); Aeroperl® 300 (APL) (Evonik, Германия); Parteck® SLC (SLC) (Merck Millipore, США);
- синтетический магния алюмосиликат – Neusilin® US2 (US2), Neusilin® UFL (UFL) (Fuji Chemical Industry Co., Ltd., Япония).

Абсорбцию ФС на МН осуществляли методами испарения органического растворителя и методом экструзии в экструдере горячего расплава.

Метод испарения органического растворителя (SW) осуществляли растворением EFA в этаноле 95 %, смесь нагревали в закрытом контейнере до 50 °С, затем наносили на МН в смесителе-грануляторе с высоким усилием сдвига Mycromix, снабженном контейнером объемом 1 л (Bosch Hüttlin GmbH, Германия). Количество сорбента рассчитывали исходя из рабочего объема 700 мл. Концентрация ФС в растворах этанола 95 % для каждого соотношения приведены в таблице 1. Скорость вращения импеллера составляла 75 мин$^{-1}$, скорость измельчителя – 1500 мин$^{-1}$. Перистальтический насос 323 U/D (Watson-Marlow Fluid Technology Group, Великобритания) работал со скоростью подачи 30 г/мин (шланг 3,2 × 1,6 мм). Далее массу выгружали и сушили в псевдоожиженном слое в лабораторной машине Solid Lab 1 (Bosch Hüttlin GmbH, Германия) при 80 °С и расходе воздуха 40 м^3/ч до остаточного содержания этанола не более 0,1 % (масс.), измерение проводили на анализаторе влажности MB23 (OHAUS, Германия) при 110 °С.

Таблица 1. Массовая доля ФС эфавиренза в растворах этанола 95 % при нанесении на МН в методе испарения растворителя

Table 1. API Efavirenz mass fraction in the 95 % ethanol solutions, when applied on mesoporous carriers in the solvent wetting method

Соотношение ФС : носитель (масс./масс.) API-carrier weight ratio	Массовая доля ФС в % в растворе 95%-го этанола API mass fraction in the 95 % ethanol solution
1:1	38,7
1:2	24,0
1:3	13,6

Экструзию горячего расплава (HME) проводили в двухшнековом экструдере Pharma 11 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Аппарат снабжен винтом диаметром 11 мм. Предварительно экструзию проводили на МН без использования ФС эфавиренза, для выбора оптимальных МН, после выбора МН, проводили экструзию ФС эфавиренз-МН. Экструзию проводили при постоянной скорости подачи порошка 500 г/ч при максимальной температуре цилиндра 140 °С, ФС эфавиренз выдерживает экструзию горячего расплава [79]. Температура первой секции экструдера (с водяным охлаждением) составляла от 15 до 25 °С, остальных секций – 140 °С; частота вращения шнеков 150 об/мин, крутящий момент 7 Н · м. Предварительно сухие порошки ФС эфавиренза и выбранные МН смешивали в смесителе-грануляторе с высоким усилием сдвига Mycromix.

Рентгеновскую порошковую дифрактометрию образцов ФС эфавиренза, МН и системы ФС эфавиренз-МН проводили с использованием автоматического порошкового дифрактометра Ultima IV (Rigaku Corporation, Япония) в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0011.15 «Рентгеновская порошковая дифрактометрия».

Просвечивающую электронную микроскопию образцов ФС эфавиренза, МН и системы ФС эфавиренз-МН в виде порошка наносили на двустороннюю проводящую углеродную ленту SPI Supplies (США), прикрепленную к алюминиевому столу. Затем образцы покрывали золотом, толщина слоя 5 нм с использованием SPI-Module Sputter Coater (SPI Supplies, США). Анализ образцов проводили на двухлучевом растровом электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режиме высокого вакуума с ускоряющим напряжением, равным 10 кВ.

Растворение ФС эфавиренза и ФС эфавиренз-МН оценивали по концентрации насыщенного раствора за определенный промежуток времени, используя в качестве растворителей (ОФС.1.3.0003.15):

- 0,1 Н раствор хлористоводородной кислоты pH 1,2;
- 0,05 М фосфатный буферный раствор pH 4,5;
- фосфатный буферный раствор pH 6,8.

Исследуемые образцы ФС эфавиренза и системы ФС эфавиренз-МН растворяли в указанных выше растворителях в тестере растворения «Лопастная мешалка» при объеме среды растворения 900 мл в 12 повторностях. Для получения насыщенного раствора ФС эфавиренза за выбранный промежуток времени добавляли в среду растворения избыток исследуемого образца. Условия проведения теста растворения по параметрам: время отбора пробы через 10, 20, 30 минут, скорость вращения лопастной мешалки 50 об/мин и температура 37 °С, соответствовали рекомендациям FDA для ЛП на основе ФС эфавиренз [10]. Через 10, 20 и 30 минут из каждого из 12 сосудов отбирали пробу и фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм, отбрасывая первые 3 мл фильтрата. Определяли концентрацию ФС в среде растворения с помощью ВЭЖХ [11].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучали соотношения систем ФС эфавиренз-МН в соотношении 1:1, 1:2, 1:3 (масс./масс.), которые получали в соответствие с методиками, описанными выше.

Во время проведения эксперимента методом горячего расплава предварительно носители были протестированы в эксперименте без ФС эфавиренза, где было обнаружено, что некоторые из них: Aeroperl® 300, Neusilin® US2, Syloid® XDP 3150, FujiSil™ нарушают свою структуру во время экструзии, данные аспекты не позволят образоваться экструдату с данными МН в неизменном состоянии МН, пригодному для дальнейших экспериментов. На основании этих данных были отобраны потенциальные носители не нарушающие свою структуру – Parteck® SLC, Neusilin® UFL, Syloid® 244FP, которые использовались в экспериментах с ФС эфавиренз.

Все полученные образцы ФС эфавиренз-МН визуально представляли собой первоначальные МН. Они были подвергнуты изучению на наличие кристаллов ФС эфавиренза, на поверхности МН.

Эфавиренз имеет кристаллическую структуру [12, 13], после проведения рентгеновской порошковой дифракции, если соотношение 1:1 ФС эфавиренз МН было рентгеноаморфно, то исследование других соотношений 1:2, 1:3 ФС эфавиренза-МН не проводились.

Интактные изначальные МН рентгеноаморфны, данные приведены в предыдущем нашем исследовании [14]. В результате исследования выяснено, что практически все системы ФС эфавиренз-МН находятся в рентгеноаморфном состоянии, только системы на основе мезопористого носителя Aeroperl® всех соотношений ФС эфавиренз-APL 1:1, 1:2, 1:3 находятся в кристаллическом состоянии, данные образцы вследствие их не рентгенноаморфного состояния были сняты с последующих исследований.

Все образцы, находящиеся в рентгенноаморфном состоянии, были переданы на исследование просвечивающей электронной микроскопии, результаты представлены на рисунке 2.

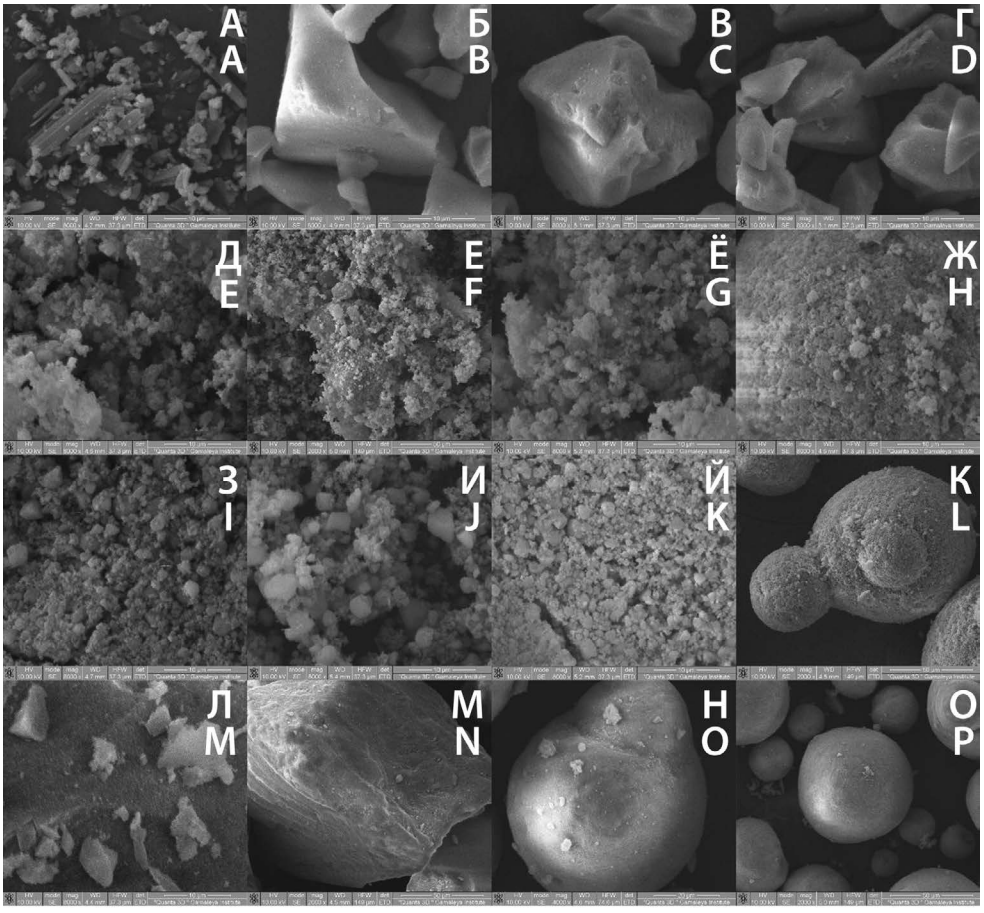


Рисунок 2. Исследование образцов ФС эфавиренза, системы ФС эфавиренз-МН, находящихся в рентгеноаморфном состоянии и МН, методом просвечивающей электронной микроскопии.

А – ФС эфавиренз; Б – МН SLC; В – EFA:SLC SW 1-1 (соотношение ФС-МН масс/масс); Г – EFA:SLC HME 1-1; Д – МН UFL; Е – EFA:UFL SW 1-1; Ё – EFA:UFL HME 1-1; Ж – МН US2; З – МН 244; И – EFA:244 SW 1-1; Й – EFA:244 HME 1-1; К – EFA:US2 SW 1-1; Л – МН 3150; М – EFA:3150 SW 1-1; Н – МН FSL; О – EFA:FSL SW 1-1

Figure 2. TEM investigation of API efavirenz, API efavirenz-mesoporous carrier (MC) Xray amorphous systems and mesoporous carriers samples.

A – API efavirenz; B – MC SLC; C – EFA:SLC SW 1-1 (API-MC weight ratio); D – EFA:SLC HME 1-1; E – MC UFL; F – EFA:UFL SW 1-1; G – EFA:UFL HME 1-1; H – MC US2; I – MC 244; J – EFA:244 SW 1-1; K – EFA:244 HME 1-1; L – EFA:US2 SW 1-1; M – MC 3150; N – EFA:3150 SW 1-1; O – MC FSL; P – EFA:FSL SW 1-1

В исследуемых рентгеноаморфных системах ФС эфавиренз-МН вся ФС эфавиренза иммобилизована в порах МН, это так же подтверждает рентгеноаморфное состояние системы ФС эфавиренз-МН, образцы системы ФС эфавиренз-МН идентичны образцам МН.

После получения результатов просвечивающей электронной микроскопии был проведен эксперимент по растворению ФС эфавиренза и рентгеноаморфных образцов ФС эфавиренз-МН. Во всех исследованных образцах концентрация ФС выходит на плато спустя 10 минут. Данные по растворению представлены в таблице 2, приведена финальная точка – 30 минут, что соответствует рекомендациям FDA [10].

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что растворение увеличивается в ряду МН SLC > FSL > UFL = US2 > 244 = 3150, что коррелирует с увеличением поверхности и уменьшением размером пор МН, представленных в публикациях [15–17], с этим и согласуется кристаллическое состояние системы ФС эфавиренз-Aeroperl® за счет самого крупного размера пор. МН UFL и US2 имеют одинаковую внутреннюю поверхность, из-за этого наблюдается практически одинаковые результаты растворения, такой же вывод можно сделать и по МН 244 и 3150, которые имеют одинаковую площадь поверхности [18, 19].

При сравнении методов получения рентгеноаморфных систем ФС эфавиренз-МН очевидно, что метод удаления растворителя дает более высокие результаты по сравнению с технологией экструзии горячего расплава. Это может быть связано, с более крупными частицами, образующимися в порах МН в момент плавления ФС эфавиренза в методе экструзии, так как весь объем пор заполнен ФС эфавиренза; в свою очередь, в методе удаления растворителя, в момент нанесения ФС эфавиренза в органическом растворителе, поры заполнены раствором ФС эфавиренза в этаноле, после удаления растворителя в порах образуется свободное пространство и частицы ФС эфавиренза. Данные полученные в этом исследовании совпадают с данными нашего предыдущего исследования на примере систем ФС дарунавира-МН и ФС дарунавира этанолата-МН [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для увеличения растворения практически нерастворимых активных фармацевтических субстанций при иммобилизации на мезопористом носителе рекомендуется использовать метод удаления растворения и следующие мезопористые носители: кремния диоксид Parteck® SLC или синтетический магния алюмосиликат Neusilin® US2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davis M., Walker G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Controlled Release*. 2018;269:110–127. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.005.
2. Gigliobianco M. R., Casadidio C., Censi R., Di Martino P. Nanocrystals of poorly soluble drugs: drug bioavailability and physicochemical stability. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):134. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030134.
3. Maleki A., Kettiger H., Schoubben A., Rosenholm J. M., Ambrogi V., Hamidi M. Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs. *Journal of Controlled Release*. 2017;262:329–347. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.07.047.
4. Repka M. A., Bandari S., Kallakunta V. R., Vo A. Q., McFall H., Pimparade M. B., Bhagurkar A. M. Melt extrusion with poorly soluble drugs–An integrated review. *International journal of pharmaceutics*. 2018;535(1–2):68–85. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.056.
5. Tran P., Pyo Y. C., Kim D. H., Lee S. E., Kim J. K., Park J. S. Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.

Таблица 2. Данные по растворению ФС эфавиренза и рентгеноаморфной системы ФС эфавиренз-МН (относительное стандартное отклонение не превышает 3 %)

Table 2. Dissolution data of API efavirenz and API efavirenz-mesoporous carrier (MC) Xray amorphous systems (RSD no more than 3 %)

Образец-метод Sample-method	pH 1,2			pH 4,5			pH 6,8		
	мкг/мл µg/ml								
	Соотношение ФС эфавиренз-МН (масс./масс.) API efavirenz-MC weight ratio								
	1-1	1-2	1-3	1-1	1-2	1-3	1-1	1-2	1-3
EFA	12,00			11,40			10,80		
EFA:SLC-HME	51,67	52,13	55,35	40,01	41,97	44,01	29,34	31,75	34,99
EFA:SLC-SW	60,02	62,01	61,97	52,27	53,72	55,00	31,58	35,63	40,66
EFA:UFL-HME	49,88	51,01	52,59	34,87	36,65	39,32	26,78	28,99	30,11
EFA:UFL-SW	51,46	57,41	59,11	51,84	53,12	54,36	32,31	35,87	36,42
EFA:US2-SW	51,87	57,29	59,27	51,45	53,42	54,02	32,57	35,63	36,53
EFA:244-HME	25,11	28,00	29,96	25,67	27,04	28,31	20,87	22,11	24,87
EFA:244-SW	31,33	37,54	39,25	40,78	43,01	43,61	25,41	26,76	28,88
EFA:3150-SW	31,34	37,23	39,13	40,59	42,96	43,75	25,27	26,95	28,72
EFA:FSL-SW	60,41	61,77	61,34	52,44	54,71	54,41	32,87	38,89	41,95

6. Vandana K. R., Raju Y. P., Chowdary V. H., Sushma M., Kumar N. V. An overview on in situ micronization technique–An emerging novel concept in advanced drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014;22(4):283–289. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.05.004.
7. Sathigari S. K., Radhakrishnan V. K., Davis V. A., Parsons D. L., Babu R. J. Amorphous-state characterization of efavirenz—polymer hot-melt extrusion systems for dissolution enhancement. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(9):3456–3464. DOI: 10.1002/jps.23125.
8. Pawar J. N., Fule R. A., Maniruzzaman M., Amin P. D. Solid crystal suspension of Efavirenz using hot melt extrusion: Exploring the role of crystalline polyols in improving solubility and dissolution rate. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;78:1023–1034. DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.055.
9. Pawar J., Suryawanshi D., Moravkar K., Aware R., Shetty V., Maniruzzaman M., Amin P. Study the influence of formulation process parameters on solubility and dissolution enhancement of efavirenz solid solutions prepared by hot-melt extrusion: a QbD methodology. *Drug delivery and translational research*. 2018;8(6):1644–1657. DOI: 10.1007/s13346-018-0481-0.
10. Niazi S. K. Handbook of Bioequivalence Testing. Boca-Raton: CRC Press; 2014. 842 p.
11. Захода О. Ю., Садчикова Н. П., Демина Н. Б., Золотов С. А., Золотова А. С., Краснюк И. И. Определение количественного содержания эфавиренза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;2:65–72.
12. Perold Z., Swanepoel E., Brits M. Anomalous dissolution behaviour of a novel amorphous form of Efavirenz. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(2):272–292.
13. Radesca L. A., Maurin M. B., Rabel S. R., Moore J. R. Crystalline Efavirenz. Patent US № 6673372 B1. 06.01.2004. Available at: https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/029738716/publication/US6673372B1?q=pn%3DUS6673372B1/ Accessed: 28.12.2021.
14. Zolotov S. A., Demina N. B., Zolotova A. S., Shevlyagina N. V., Buzanov G. A., Retivov V. M., Kozhukhova E. I., Zakhoda O. Y., Dain I. A., Filatov A. R., Cheremisin A. M. Development of novel darunavir amorphous solid dispersions with mesoporous carriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;159:105700. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105700.
15. Vraníková B., Niederquell A., Šklubalová Z., Kuentz M. Relevance of the theoretical critical pore radius in mesoporous silica for fast crystallizing drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;591:120019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120019.
16. Technical Data Sheet FujiSil™. Available at: https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/05/FujiSil-TDS_20190717_FINAL-US_LR_formail.pdf. Accessed: 28.12.2021.
17. Waters L. J., Hanrahan J. P., Tobin J. M., Finch C. V., Parkes G. M., Ahmad S. A., Mohammad F., Saleem M. Enhancing the dissolution of phenylbutazone using Syloid® based mesoporous silicas for oral equine applications. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2018;8(3):181–186. DOI: 10.1016/j.jpha.2018.01.004.
18. Neusilin® General properties and grades. Available at: https://tech-en.fujichemical.co.jp/neusilin-info. Accessed: 28.12.2021.
19. Knapik-Kowalczuk J., Kramarczyk D., Chmiel K., Romanova J., Kawakami K., Paluch M. Importance of Mesoporous Silica Particle Size in the Stabilization of Amorphous Pharmaceuticals – The Case of Simvastatin. *Pharmaceutics*. 2020;12(4):384. DOI: 10.3390/pharmaceutics12040384.

REFERENCES

1. Davis M., Walker G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of Controlled Release*. 2018;269:110–127. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.005.
2. Gigliobianco M. R., Casadidio C., Censi R., Di Martino P. Nanocrystals of poorly soluble drugs: drug bioavailability and physicochemical stability. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):134. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030134.
3. Maleki A., Kettiger H., Schoubben A., Rosenholm J. M., Ambrogi V., Hamidi M. Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs. *Journal of Controlled Release*. 2017;262:329–347. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.07.047.
4. Repka M. A., Bandari S., Kallakunta V. R., Vo A. Q., McFall H., Pimparade M. B., Bhagurkar A. M. Melt extrusion with poorly soluble drugs–An integrated review. *International journal of pharmaceutics*. 2018;535(1–2):68–85. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.056.
5. Tran P., Pyo Y. C., Kim D. H., Lee S. E., Kim J. K., Park J. S. Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.
6. Vandana K. R., Raju Y. P., Chowdary V. H., Sushma M., Kumar N. V. An overview on in situ micronization technique–An emerging novel concept in advanced drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014;22(4):283–289. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.05.004.
7. Sathigari S. K., Radhakrishnan V. K., Davis V. A., Parsons D. L., Babu R. J. Amorphous-state characterization of efavirenz—polymer hot-melt extrusion systems for dissolution enhancement. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2012;101(9):34563464. DOI: 10.1002/jps.23125.
8. Pawar J. N., Fule R. A., Maniruzzaman M., Amin P. D. Solid crystal suspension of Efavirenz using hot melt extrusion: Exploring the role of crystalline polyols in improving solubility and dissolution rate. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;78:1023–1034. DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.055.
9. Pawar J., Suryawanshi D., Moravkar K., Aware R., Shetty V., Maniruzzaman M., Amin P. Study the influence of formulation process parameters on solubility and dissolution enhancement of efavirenz solid solutions prepared by hot-melt extrusion: a QbD methodology. *Drug delivery and translational research*. 2018;8(6):1644–1657. DOI: 10.1007/s13346-018-0481-0.
10. Niazi S. K. Handbook of Bioequivalence Testing. Boca-Raton: CRC Press; 2014. 842 p.
11. Zakhoda O. Yu., Sadchikova N. P., Demina N. B., Zolotov S. A., Zolotova A. S., Krasnyuk I. I. Determination of the quantitative content of efavirenz by high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;2:65–72. (In Russ.)
12. Perold Z., Swanepoel E., Brits M. Anomalous dissolution behaviour of a novel amorphous form of Efavirenz. *American Journal of PharmTech Research*. 2012;2(2):272–292.
13. Radesca L. A., Maurin M. B., Rabel S. R., Moore J. R. Crystalline Efavirenz. Patent US № 6673372 B1. 06.01.2004. Available at: https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/029738716/publication/US6673372B1?q=pn%3DUS6673372B1/ Accessed: 28.12.2021.
14. Zolotov S. A., Demina N. B., Zolotova A. S., Shevlyagina N. V., Buzanov G. A., Retivov V. M., Kozhukhova E. I., Zakhoda O. Y., Dain I. A., Filatov A. R., Cheremisin A. M. Development of novel darunavir amorphous solid dispersions with mesoporous carriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;159:105700. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105700.
15. Vraníková B., Niederquell A., Šklubalová Z., Kuentz M. Relevance of the theoretical critical pore radius in mesoporous silica for fast crystallizing drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;591:120019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120019.
16. Technical Data Sheet FujiSil™. Available at: https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/05/FujiSil-TDS_20190717_FINAL-US_LR_formail.pdf. Accessed: 28.12.2021.
17. Waters L. J., Hanrahan J. P., Tobin J. M., Finch C. V., Parkes G. M., Ahmad S. A., Mohammad F., Saleem M. Enhancing the dissolution of phenylbutazone using Syloid® based mesoporous silicas for oral equine applications. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2018;8(3):181–186. DOI: 10.1016/j.jpha.2018.01.004.
18. Neusilin® General properties and grades. Available at: https://tech-en.fujichemical.co.jp/neusilin-info. Accessed: 28.12.2021.
19. Knapik-Kowalczuk J., Kramarczyk D., Chmiel K., Romanova J., Kawakami K., Paluch M. Importance of Mesoporous Silica Particle Size in the Stabilization of Amorphous Pharmaceuticals – The Case of Simvastatin. *Pharmaceutics*. 2020;12(4):384. DOI: 10.3390/pharmaceutics12040384.


БИОТЕХМЕД
Сочи, 2022
19.09 – 20.09
biotechmedconf.ru

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-91-96
УДК 615.032:615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Условия экстрагирования сапонинов *Solidágo virgáurea*

М. У. Сергалиева✉, А. В. Самотруев, А. А. Цибизова

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Астраханьский ГМУ» Минздрава России), 414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121

✉ **Контактное лицо:** Сергалиева Мариям Утежановна. **E-mail:** charlina_astr@mail.ru

ORCID: М. У. Сергалиева – https://orcid.org/0000-0002-9630-2913; А. В. Самотруев – https://orcid.org/0000-0002-3918-0278; А. А. Цибизова – https://orcid.org/0000-0002-9994-4751.

Статья поступила: 14.10.2021 **Статья принята в печать:** 05.03.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В настоящее время, несмотря на достижения в синтезе химических субстанций, наблюдается тенденция к расширению использования лекарственных препаратов растительного происхождения, применение которых оправдано относительной безопасностью и широтой фармакологической активности. Одними из перспективных источников биологически активных веществ являются растения рода Золотарник, насчитывающего более 20 видов растений. Несмотря на активное ботаническое и фармакологическое изучение растений рода Золотарник, на сегодняшний день научных данных недостаточно. Кроме того, получение извлечений на основе травы Золотарника детально не изучены, что определяет актуальность исследования представителей данного рода в технологическом аспекте.

Цель. Определение оптимальных условий экстрагирования биологически активных веществ из травы *Solidago virgaurea*.

Материалы и методы. В качестве исследуемого растительного сырья была использована трава Золотарник обыкновенный (*Solidago virgaurea*), собранная в период цветения. Сушка сырья производилась естественным теневым способом. Сумму экстрактивных веществ в водных извлечениях травы Золотарника обыкновенного определяли по фармакопейной методике (ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»). Биологически активные соединения из высушенного и измельченного сырья экстрагировали 40%-м, 60%-м, 80%-м и 96%-м раствором этилового спирта. Количественное содержание биологически активных веществ в извлечениях травы *Solidago virgaurea* определяли по сухому остатку. Процентное содержание сапонинов в исследуемом растительном сырье определяли в пересчете на олеаноловую кислоту методом прямой спектрофотометрии, основанным на реакции с серной кислотой.

Результаты и обсуждение. Освещены вопросы изучения факторов, влияющих на качество экстрагирования сапонинов травы Золотарника обыкновенного. Изучено влияние степени измельченности сырья, режима настаивания и вида экстрагента на полноту выхода сапонинов. По результатам исследования условий экстрагирования биологически активных соединений водных извлечений травы *Solidago virgaurea* выявлено, что максимальное количество биологически активных веществ получено в извлечениях, приготовленных на основе травы, измельченной до размера 2 мм, путем настаивания на водяной бане в течение 30 минут. Установлено, что количественное содержание сапонинов в траве *Solidago virgaurea* составляет 9,8 ± 1,2 %.

Заключение. На основании проведенных исследований выявлена наиболее рациональная технология водного извлечения на основе травы *Solidago virgaurea*: степень измельчения сырья 2 мм; в качестве экстрагента наиболее оптимальным для сапонинов – 60%-й этанол; режим настаивания – 30 минут на кипящей водяной бане. По полученным результатам количественного анализа установлено, что суммарное содержание сапонинов в траве Золотарника обыкновенного составляет 9,8 ± 1,2 %, что подчеркивает актуальность более детальных исследований данного растительного сырья с позиции количественного определения биологически активных веществ и определения возможного спектра фармакологических свойств.

Ключевые слова: *Solidago virgaurea*, биологически активные вещества, сапонины, количественный анализ, факторы экстрагирования

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

Вклад авторов. М. У. Сергалиева разработала концепцию и дизайн исследования, спланировала исследование. А. В. Самотруев написал текста, сделал анализ полученных результатов, подготовил черновик рукописи. А. А. Цибизова сделала сбор данных, оценку, обоснование и статистическую обработку полученных данных, подготовила черновик рукописи.

Для цитирования: Сергалиева М. У., Самотруев А. В., Цибизова А. А. Условия экстрагирования сапонинов *Solidágo virgáurea*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):91–96. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-91-96

Conditions for Extraction of Saponins *Solidágo virgáurea*

Mariyam U. Sergalieva✉, Andrei V. Samotruev, Aleksandra A. Tsibizova

Astrakhan State Medical University, 121, Bakuskaya str., Astrakhan, 414000, Russia

✉ **Corresponding author:** Mariyam U. Sergalieva. **E-mail:** charlina_astr@mail.ru

ORCID: Mariyam U. Sergalieva – https://orcid.org/0000-0002-9630-2913; Andrei V. Samotruev – https://orcid.org/0000-0002-3918-0278; Aleksandra A. Tsibizova – https://orcid.org/0000-0002-9994-4751.

Received: 14.10.2021 **Revised:** 05.03.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Currently, despite the achievements in the synthesis of chemical substances, there is a tendency to expand the use of herbal medicines, the use of which is justified by the relative safety and breadth of pharmacological activity. One of the promising sources of biologically active substances are plants of the genus Goldenrod, which has more than 20 plant species. Despite the active botanical and pharmacological

© Сергалиева М. У., Самотруев А. В., Цибизова А. А., 2022
© Sergalieva M. U., Samotruev A. V., Tsibizova A. A., 2022

study of plants of the genus *Solidago*, there is insufficient scientific data to date. In addition, the extraction of extracts based on *Solidago* grass has not been studied in detail, which determines the relevance of the study of representatives of this genus in the technological aspect.
Aim. Determination of optimal conditions for the extraction of biologically active substances from the grass of *Solidago virgaurea*.
Materials and methods. The herb *Solidago virgaurea*, collected during the flowering period, was used as the studied plant raw material. Drying of raw materials was carried out in a natural shadow way. The amount of extractive substances in the aqueous extracts of *Solidago* grass was determined by the pharmacopoeia method (OFS.1.5.3.0006.15 Determination of the content of extractive substances in medicinal plant raw materials and medicinal plant preparations). Biologically active compounds from dried and crushed raw materials were extracted with 40 %, 60 %, 80 % and 96 % ethyl alcohol solution. The quantitative content of biologically active substances in extracts of the herb *Solidago virgaurea* was determined by the dry residue. The percentage of saponins in the studied plant raw materials was determined in terms of oleanolic acid by direct spectrophotometry based on the reaction with sulfuric acid.
Results and discussion. The issues of studying the factors affecting the quality of extraction of saponins of *Solidago* grass are highlighted. The influence of the degree of grinding of raw materials, the mode of infusion and the type of extractant on the completeness of saponin yield has been studied. According to the results of the study of the extraction conditions of biologically active compounds of aqueous extracts of *Solidago virgaurea* grass, it was revealed that the maximum amount of biologically active substances was obtained in extracts prepared on the basis of grass crushed to a size of 2 mm by infusing in a water bath for 30 minutes. It was found that the quantitative content of saponins in *Solidago virgaurea* grass is 9.8 ± 1.2 %.
Conclusion. Based on the conducted research, the most rational technology of water extraction based on the herb *Solidago virgaurea* has been identified: the degree of grinding of raw materials is 2 mm; as an extractant, 60 % ethanol is the most optimal for saponins; the infusion mode is 30 minutes in a boiling water bath. According to the obtained results of quantitative analysis, it was found that the total saponin content in the grass of *Solidago* is 9.8 ± 1.2 %, which emphasizes the relevance of more detailed studies of this plant raw material from the standpoint of quantitative determination of biologically active substances and determination of a possible spectrum of pharmacological properties.

Keywords: *Solidago virgaurea*, biologically active substances, saponins, quantitative analysis, extraction factors

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. Mariyam U. Sergalieva development of the concept and design of research, study planning. Andrei V. Samotruev wrote the text, analyzing the results obtained, preparing a draft manuscript. Aleksandra A. Tsibizova collected data, assessment, justification and statistical processing of the obtained data, preparation of a draft manuscript.

For citation: Sergalieva M. U., Samotruev A. V., Tsibizova A. A. Conditions for extraction of saponins *Solidágo virgáurea*. *Drug development & registration*. 2022;11(3):91–96. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-91-96

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на достижения в синтезе химических субстанций, наблюдается тенденция к расширению использования лекарственных препаратов растительного происхождения, применение которых оправдано относительной безопасностью и широтой фармакологической активности [1–3].

Одними из перспективных источников биологически активных веществ (БАВ) являются растения рода Золотарник, насчитывающего более 20 видов растений. Наиболее распространенными являются золотарник обыкновенный (*Solidago virgaurea* L.), канадский (*Solidago canadensis* L.), гигантский (*Solidago gigantea* Aiton) и кавказский (*Solidago caucasica* Kem.-Nath.). Ботаническая характеристика растений этого рода хорошо изучена. Все золотарники представляют собой многолетние травянистые растения, произрастающие в основном на территории Сибири и Северного Кавказа [4, 5].

В народной медицине они используются в качестве фитопрепаратов, обладающих противовоспалительным, антисептическим, диуретическим, урато- и оксалатолитическим свойствами [6, 7]. Исследования последних лет доказывают также антибактериальную, противогрибковую, вазодилататорную, иммуномодулирующую и противоопухолевую активность растений рода Золотарник [8, 9]. Золотарник канадский наряду с перечисленными свойствами оказывает также капилляроукрепляющее и антиоксидантное действие [10]. Установлено, что экстракт золотарника обладает гиполипидемическим, гипогликемическим действием и активно применяется в лечении метаболического синдрома и сахарного диабета [10–12]. Стоит отметить, что на сегодняшний день Золотарник используется в качестве одного из компонентов комплексных биологических препаратов, например, Марелин®, Простанорм®, Фитолизин® и др. Несмотря на активное ботаническое и фармакологическое изучение растений рода Золотарник, на сегодняшний день научных данных недостаточно. Кроме того, получение извлечений на основе травы Золотарника детально не изучены, что дает предпосылки для исследования представителей данного рода в технологическом аспекте и определяет актуальность данного направления.

Анализ литературных источников показывает, что наиболее часто Золотарник применяется в виде водных извлечений, лечебный эффект которых обусловлен входящими в их состав биологически ак-

тивными веществами [13], в том числе и сапонинами, которые обеспечивают указанное выше фармакологическое действие [14–16]. Установлено, что выход суммы экстрактивных веществ в извлечениях зависит от многих факторов, среди которых наиболее значимыми являются размер частиц лекарственного сырья, вид экстрагента и режим экстракции, обеспечивающие рациональную технологию и оптимальный выход активных веществ, от чего в конечном итоге зависит выраженность терапевтического эффекта экстракта [17].

Целью исследования явилось количественное определение содержания суммы сапонинов в траве *Solidago virgaurea* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился Золотарник обыкновенный (*Solidago virgaurea* L.). В качестве исследуемого растительного сырья была использована трава, собранная в период цветения. Сушка сырья производилась естественным теневым способом. Потеря массы сырья при высушивании составила 7,8 %. В работе были изучены факторы, влияющие на экстрагирование биологически активных веществ: степень измельченности сырья, вид экстрагента, время и кратность экстракции с применением методик, регламентируемых ГФ: ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» и ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [4].

В основу эксперимента была положена методика количественного определения суммы сапонинов в растительном сырье методом прямой спектрофотометрии, основанным на реакции с серной кислотой. Для установления оптимальных условий для количественной идентификации сапонинов в сырье Золотарника обыкновенного нами была проведена серия экспериментов (5 серий) по экстрагированию высушенной и измельченной травы данного растения этиловым спиртом, как экстрагентом различной концентрации (40%-м, 60%-м, 80%-м и 96%-м раствором этанола). Количество сапонинов определяли в пересчете на олеаноловую кислоту (CAS № 508-02-1, чистота основного вещества более 99 %). Измерение оптических плотностей проводили на спектрофотометре модели LEKI SS1207UV (LEKI, Финляндия). Эксперименты повторяли в 5 сериях. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием унифицированных метрологических характеристик.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения влияния условий экстракции на выход сапонинов из травы Золотарника обыкновенного, а также их метрологическая характеристика продемонстрированы в таблицах 1, 2.

Таблица 1. Результаты определения влияния условий экстракции на выход сапонинов из травы *Solidago virgaurea*

Table 1. Results of determining the effect of extraction conditions on the yield of saponins from the herb *Solidago virgaurea*

Условия экстракции Extraction conditions	**Содержание суммы сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту, %** Content of total saponins in terms of oleanolic acid, %
Размер частиц сырья, мм Raw material particle size, mm	
1	8,9
2	9,8
3	9,2
4–6	4,6
Концентрация этанола, % Ethanol concentration, %	
40	8,5
60	9,8
80	6,7
96	4,2
Время и кратность экстракции, мин Time and frequency of extraction, min	
2-кратная по 30 2-fold by 30	6,7
3-кратная по 30 3-fold by 30	9,8
4-кратная по 30 4-fold by 30	8,4
5-кратная по 30 5-fold by 30	8,1

Таблица 2. Метрологическая характеристика определения сапонинов в траве *Solidago virgaurea*

Table 2. Metrological characteristics of the determination of saponins in the herb *Solidago virgaurea*

№	**Масса навески, г** Sample weight, g	**Оптическая плотность (A)** Optical depth (A)	**Содержание (X), %** Content (X), %	**Метрологические данные** Metrological data
1	2,008	0,742	9,8	$X_{ср.} = 9,7$ $X_{av.} = 9,7$
2	2,006	0,731	9,7	$S^2 = 0,0280$
3	2,007	0,696	9,6	$S = 0,1243$
4	2,007	0,694	9,6	$S_{X_{ср.}} = 0,0580$ $S_{X_{av.}} = 9,7$
5	2,008	0,742	9,8	$\varepsilon_{ср.} = 1,22$ % $\varepsilon_{av.} = 1,22$ %

В ходе проведения эксперимента нами были получены следующие результаты: при идентификации сапонинов с применением в качестве экстрагента 40%-го раствора этанола наблюдался максимум светопоглощения при длине волны 220 нм. Спектр поглощения суммы сапонинов водно-спиртового извлечения травы *Solidago virgaurea* представлен на рисунке 1.

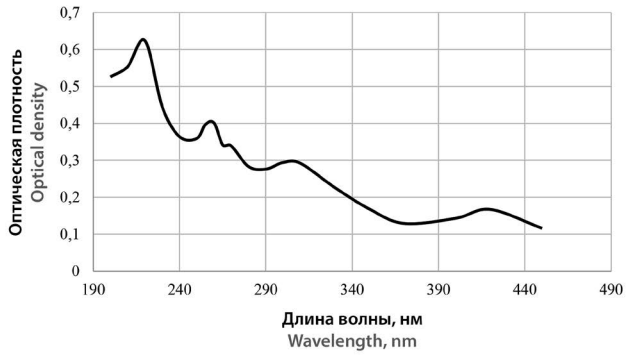


Рисунок 1. Спектр поглощения комплекса сапонинов 40%-го водно-спиртового извлечения травы *Solidago virgaurea* с концентрированной серной кислотой

Figure 1. Absorption spectrum of saponin complex 40 % water-alcohol extraction of the herb Solidago virgaurea with concentrated sulfuric acid

При количественном определении сапонинов в водно-этанольном извлечении травы Золотарника с концентрацией экстрагента 60 % максимум поглощения наблюдался при длине волны 220 нм и оптической плотности 0,742 (рисунок 2).

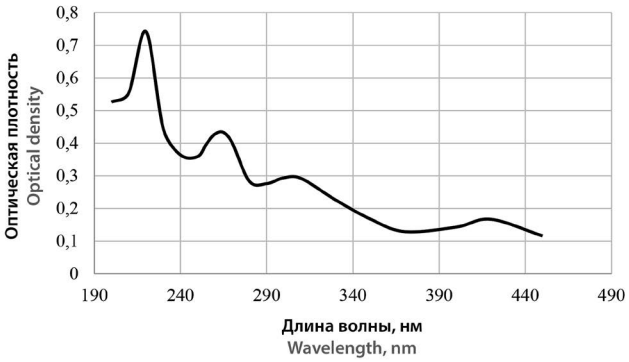


Рисунок 2. Спектр поглощения комплекса сапонинов 60%-го водно-спиртового извлечения травы *Solidago virgaurea* с концентрированной серной кислотой

Figure 2. Absorption spectrum of saponin complex 60 % water-alcohol extraction of the herb Solidago virgaurea with concentrated sulfuric acid

Максимум поглощения сапонинов, содержащихся в 80%-м водно-спиртовом извлечении *Solidago virgaurea*, наблюдался при длине волны 220 нм и оптической плотности 0,431 (рисунок 3).

При концентрации экстрагента 96 % максимальный выход сапонинов извлечения травы *Solidago virgaurea* наблюдали при длине волны 220 нм и оптической плотности 0,377 (рисунок 4).

По полученным результатам количественного анализа установлено, что суммарное содержание сапонинов в траве Золотарника обыкновенного составляет 9,8 ± 1,2 %, что подчеркивает актуальность более

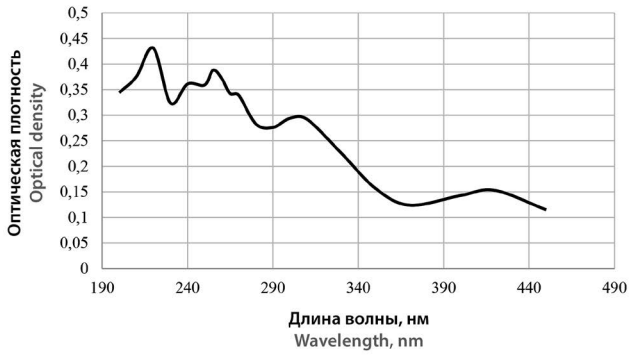


Рисунок 3. Спектр поглощения комплекса сапонинов 80%-го водно-спиртового извлечения травы *Solidago virgaurea* с концентрированной серной кислотой

Figure 3. Absorption spectrum of saponin complex 80 % water-alcohol extraction of the herb *Solidago virgaurea* with concentrated sulfuric acid

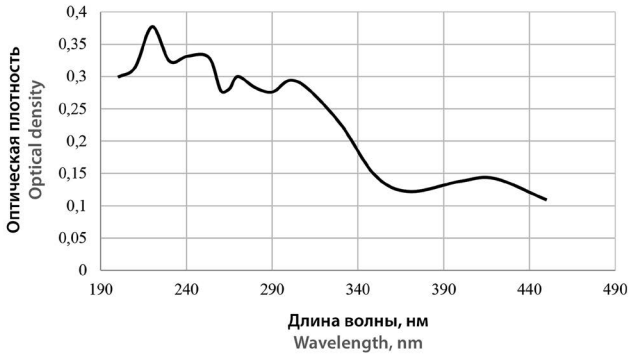


Рисунок 4. Спектр поглощения комплекса сапонинов 96%-го водно-спиртового извлечения травы *Solidago virgaurea* с концентрированной серной кислотой

Figure 4. Absorption spectrum of saponin complex 96 % water-alcohol extraction of the herb *Solidago virgaurea* with concentrated sulfuric acid

детальных исследований данного растительного сырья с позиции количественного определения биологически активных веществ и определения возможного спектра фармакологических свойств.

Анализ полученных результатов по количественному содержанию сапонинов в водно-спиртовых извлечениях травы Золотарника обыкновенного показывает, что максимальный выход суммы сапонинов наблюдается в условиях экстрагирования 60%-м раствором спирта этилового (таблица 3).

При анализе литературных данных о количественном содержании биологически активных веществ растений рода Золотарник было установлено, что основные научные данные касаются количественного содержания полифенольных биологически активных веществ. При определении количества сапонинов данные свидетельствуют о сниженном содержании указанного БАВ, например Золотарник даурский и

канадский в сравнении с *Solidago virgaurea*, что вероятнее связано с климатическими особенностями произрастания различных видов Золотарника. Установлено, что основное распространение *Solidago daurica* и *Solidago canadensis* наблюдается в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке, тогда как *Solidago virgaurea* распространен на всей территории Российской Федерации, в том числе и южные области, что и определяет более высокое содержание биологически активных веществ [18, 19].

Таблица 3. Сравнительная характеристика содержания сапонинов в водно-спиртовых извлечениях травы *Solidago virgaurea* при длине волны 220 нм

Table 3. Comparative characteristics of saponin content in water-alcohol extractions of the herb *Solidago virgaurea* at 220 nm wavelength

Концентрация извлечения, % Extraction concentration, %	**Оптическая плотность** Optical density	**Содержание сапонинов, %** Saponin content, %
40	0,624	0,94
60	0,742	9,8
80	0,431	0,91
96	0,377	0,78

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований выявлены оптимальные условия и параметры экстрагирования сапонинов из травы Золотарника обыкновенного. Проведена сравнительная оценка содержания сапонинов в извлечениях травы Золотарника обыкновенного в разном соотношении вода : этиловый спирт. Установлено, что наиболее оптимальной концентрацией экстрагента, обеспечивающей наибольший выход экстрактивных веществ, является 60%-й раствор этилового спирта.

Полученные в ходе исследования экспериментальные данные по наличию сапонинов в траве Золотарника обыкновенного (*Solidago virgaurea*) свидетельствуют о значительном их содержании в данном сырье, что определяет широкий спектр фармакологической активности растительного источника и является основанием для дальнейших исследований по идентификации других биологически активных веществ с целью разработки новых фитосредств на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Falzon C. C., Balabanova A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Prim Care*. 2017;44(2):217–227. DOI: 10.1016/j.pop.2017.02.001.
2. Сергалиева М. У., Мажитова М. В., Самотруева М. А. Биологическая активность экстрактов растений рода Astragalus. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;5.
3. Lopes C. M. C., Lazzarini J. R., Soares Júnior J. M., Baracat E. C. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? *Rev Assoc Med Bras*. 2018;64(9):765–768. DOI: 10.1590/1806-9282.64.09.765.
4. Федотова В. В., Челомбитько В. А. Виды рода Золотарник (Solidago): значение для медицинской практики, перспективы изучения. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2012;16(135):136–145.
5. Fursenco C., Calalb T., Uncu L., Dinu M., Ancuceanu R. Solidago virgaurea L.: A Review of Its Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Biomolecules*. 2020;10(12):1619. DOI: 10.3390/biom10121619.
6. Сонова К. В. Использование Золотарника в современной медицине. *Научный медицинский вестник*. 2015;2:61–67.
7. Савустьяненко А. В. Применение экстрактов Золотарника обыкновенного (Solidago virgaurea L.) для лечения заболеваний мочевыводящих путей. *Почки*. 2014;3(9):29–37.
8. Precheur I., Rolland Y., Hasseine L., Orange F., Morisot A., Landreau A. Solidago virgaurea L. Plant Extract Targeted Against Candida albicans to Reduce Oral Microbial Biomass: a Double Blind Randomized Trial on Healthy Adults. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(4):137. DOI: 10.3390/antibiotics9040137.
9. Федотова В. В., Челомбитько В. А., Постникова Н. В. Фенольные соединения и антибактериальное действие сухого экстракта Золотарника кавказского (Solidago caucasica kem.-nath.). *Медицинский альманах*. 2013;1(25):185–188.
10. El-Tantawy W. H. Biochemical effects of Solidago virgaurea extract on experimental cardiotoxicity. *J Physiol Biochem*. 2014;70(1):33–42. DOI: 10.1007/s13105-013-0277-0.
11. Ying H., Hao Y.-L., Mai X.-Y. Chemical constituents from Solidago canadensis with hypolipidemic effects in HFD-fed hamsters. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2013;15(4):319–324. DOI: 10.1080/10286020.2012.753059.
12. Sanad F. A., Ahmed S. F., El-Tantawy W. H. Antidiabetic and hypolipidemic potentials of Solidago virgaurea extract in alloxan-induced diabetes type 1. *Arch Physiol Biochem*. 2020;6:1–8. DOI: 10.1080/13813455.2020.1722705.
13. Забалуева Ю. Ю., Баженова Б. А., Бурханова А. Г., Мелешкина Н. В., Андреева С. В. Изучение качества настоев и отваров из растительного сырья. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016;12–3(54):87–89.
14. Zhang T., Zhong S., Li T., Zhang J. Saponins as modulators of nuclear receptors. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(1):94–107. DOI: 10.1080/10408398.2018.1514580.
15. Juang Y. P, Liang P. H. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules*. 2020;25(21):4974. DOI: 10.3390/molecules25214974.
16. Горячкина Е. Г., Буинов М. В., Федосеева Г. М. Сравнительное изучение кумаринов надземных органов Золотарников канадского, обыкновенного и даурского. *Вопросы естествознания*. 2013;1(1):8–12.
17. Пиминов А. Ф., Безценная Т. С., Шульга Л. И. Изучение влияния фармацевтических факторов на получение водного извлечения из лекарственного растительного сбора. *Вестник фармации*. 2014;1(63):27–32.
18. Сулейманова Ф. Ш. К., Нестерова О. В., Матюшин А. А. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья травы золотарника канадского (Solidago canadensis L.). *Сеченовский вестник*. 2018;3(33):64–68. DOI: 10.26442/2218-7332_2018.3.64-68.
19. Сулоев И. С., Дудецкая Н. А., Теслов Л. С., Лужанин В. Г., Яковлев Г. П. О некоторых видах рода Золотарник (обзор). *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2019;21(6):68–76. DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-6-68-76.

REFERENCES

1. Falzon C. C., Balabanova A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Prim Care*. 2017;44(2):217–227. DOI: 10.1016/j.pop.2017.02.001.

2. Sergalieva M. U., Mazhitova M. V., Samotrueva M. A. Biological activity of extracts of plants of the sort Astragalus. *Modern Problems of Science and Education*. 2015;5. (In Russ.)
3. Lopes C. M. C., Lazzarini J. R., Soares Júnior J. M., Baracat E. C. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? *Rev Assoc Med Bras*. 2018;64(9):765–768. DOI: 10.1590/1806-9282.64.09.765.
4. Fedotova V. V., Chelombitko V. A. Species of goldenrod (Solidago): importance for medical practice, the prospects of studying. *Scientific bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacia*. 2012;16(135):136–145. (In Russ.)
5. Fursenco C., Calalb T., Uncu L., Dinu M., Ancuceanu R. Solidago virgaurea L.: A Review of Its Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Biomolecules*. 2020;10(12):1619. DOI: 10.3390/biom10121619.
6. Sonova K. V. The use of Solidago in modern medicine. *Scientific Medical Bulletin*. 2015;2:61–67. (In Russ.)
7. Savust'yanenko A. V. The use of ordinary extracts of Solidago (Solidago virgaurea L.) for the treatment of diseases of the urinary tract. *Pochki*. 2014;3(9):29–37. (In Russ.)
8. Precheur I., Rolland Y., Hasseine L., Orange F., Morisot A., Landreau A. Solidago virgaurea L. Plant Extract Targeted Against Candida albicans to Reduce Oral Microbial Biomass: a Double Blind Randomized Trial on Healthy Adults. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(4):137. DOI: 10.3390/antibiotics9040137.
9. Fedotova V. V., Chelombit'ko V. A., Postnikova N. V. Phenolic compounds and antimicrobial activity of dry extract of Solidago caucasica (Solidago caucasica kem.-nath.). *Medical Almanac*. 2013;1(25):185–188. (In Russ.)
10. El-Tantawy W. H. Biochemical effects of Solidago virgaurea extract on experimental cardiotoxicity. *J Physiol Biochem*. 2014;70(1):33–42. DOI: 10.1007/s13105-013-0277-0.
11. Ying H., Hao Y.-L., Mai X.-Y. Chemical constituents from Solidago canadensis with hypolipidemic effects in HFD-fed hamsters. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2013;15(4): 319–324. DOI: 10.1080/10286020.2012.753059.
12. Sanad F. A., Ahmed S. F., El-Tantawy W. H. Antidiabetic and hypolipidemic potentials of Solidago virgaurea extract in alloxan-induced diabetes type 1. *Arch Physiol Biochem*. 2020;6:1–8. DOI: 10.1080/13813455.2020.1722705.
13. Zabalueva Yu. Yu., Bazhenova B. A., Burkhanova A. G., Meleshkina N. V., Andreeva S. V. The study of the quality of extracts and decoctions from plant material. *International Research Journal*. 2016;12-3(54):87–89. (In Russ.)
14. Zhang T., Zhong S., Li T., Zhang J. Saponins as modulators of nuclear receptors. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(1):94–107. DOI: 10.1080/10408398.2018.1514580.
15. Juang Y. P, Liang P. H. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules*. 2020;25(21):4974. DOI: 10.3390/molecules25214974.
16. Goryachkina E. G., Buinov M. V., Fedoseeva G. M. Comparative studying of coumarin selevated bodies of Solidago canadensis, virgaurea and daurica. *Voprosy estestvoznaniya*. 2013;1(1):8–12. (In Russ.)
17. Piminov A. F., Beztsennaya T. S., Shul'ga L. I. The study of the influence of pharmaceutical factors on obtaining the water extract from medicinal plant collection. *Vestnik farmatsii*. 2014;1(63):27–32. (In Russ.)
18. Suleymanova F. Sh. K., Nesterova O. V., Matyushin A. A. Study of technological parameters and numerical indicators of the quality of raw materials grass of Solidago canadensis (Solidago canadensis L.). *Sechenov Medical Journal*. 2018;3(33):64–68. (In Russ.) DOI: 10.26442/2218-7332_2018.3.64-68.
19. Suloev I. S., Dudetskaya N. A., Teslov L. S., Luzhanin V. G., Yakovlev G. P. About some species of genus goldenrod (Review). *Medical and pharmaceutical journal «Pulse».* 2019;21(6):68–76. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-6-68-76.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-97-112
УДК 577.352.26

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Конструкция иммунолипосом (обзор)

М. В. Дмитриева[1]✉, И. В. Ярош[2], Е. В. Санарова[1], А. В. Ланцова[1], О. Л. Орлова[1]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина) 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24
[2] АО «Р-Фарм», Россия, 119421, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 111, к. 1

✉ **Контактное лицо:** Дмитриева Мария Вячеславовна. **E-mail:** dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: М. В. Дмитриева – https://orcid.org/0000-0001-6740-5692; И. В. Ярош – https://orcid.org/0000-0002-3347-9674; Е. В. Санарова – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137; А. В. Ланцова – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023; О. Л. Орлова – https://orcid.org/0000-0002-4558-0083.

Статья поступила: 14.01.2022 **Статья принята в печать:** 00.00.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Благодаря открытию антител (АТ), нацеливающей молекулы с высокой специфичностью к лиганду, концепция «волшебная пуля» была успешно реализована с различными иммуноконъюгированными лекарственными средствами (ЛС). С 1980 г. для повышения специфичности и эффективности лекарственной терапии стали широко исследоваться конъюгаты АТ с липосомами, т. е. иммунолипосомы (ИЛ). Данный обзор посвящен характеристике основных структурных единиц ИЛ на основе анализа данных оригинальных и обзорных статей по теме исследования из баз PubMed, ResearchGate и КиберЛенинка.

Текст. ИЛ представляют собой липосомы, к которым обычно посредством специального линкера прикреплены АТ, их фрагменты или иные лиганды. ИЛ используются для доставки противоопухолевых, сердечно-сосудистых, противовирусных, противопротозойных ЛС, генетического материала, визуализирующих молекул и др. ИЛ могут быть получены из различных фосфолипидов как природного, так и синтетического происхождения, заряженных или нейтральных. Наиболее широко используемыми фосфолипидами в иммунолипосомальной конструкции являются фосфатидилхолины. Для повышения механической устойчивости бислоя в липидную композицию вводят стерины. Для селективной доставки липосом нацеливающие лиганды должны быть прикреплены к наноносителю через спейсерное плечо ПЭГ. Для этой цели используют несколько типов функционализированных концевыми группами липополимеров обычно общей формулы X-PEG-LI, где X представляет собой фрагмент, содержащий реакционноспособную функциональную группу, – малеимид, биотин, цианур, амин и др. Эти липидные ПЭГ-конъюгаты демонстрируют превосходные амфифильные свойства и предлагают превосходные преимущества для модификации, формулирования и доставки различных ЛС. Используемое АТ должно усиливать накопление липосомального ЛС в целевых областях с минимальной перекрестной реактивностью со здоровыми тканями. При приготовлении ИЛ используют готовые лекарственные препараты на основе моноклональных АТ, например трастузумаб, цетуксимаб, панитумумаб, бевацизумаб, также применяют коммерческие АТ, предназначенные для исследовательских целей, и синтезированные в лабораторных условиях АТ и их фрагменты. АТ могут быть прикреплены к липосомам двумя основными способами: прямой ковалентной конъюгации и постинсерционным методом.

Заключение. Результаты проведенного исследования позволили обобщить многообразие литературных данных о составе ИЛ и возможности использования вспомогательных компонентов для достижения поставленной цели при разработке препарата.

Ключевые слова: иммунолипосомы, пегилированные липосомы, липиды, антитело, антиген, линкер

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

Вклад авторов. М. В. Дмитриева осуществила написание текста статьи, сбор и обработку литературных данных. И. В. Ярош, Е. В. Санарова, А. В. Ланцова сделали сбор и обработку литературных данных, перевод. О. Л. Орлова осуществила дизайн исследования, проверку окончательной версии статьи.

Для цитирования: Дмитриева М. В., Ярош И. В., Санарова Е. В., Ланцова А. В., Орлова О. Л. Конструкция иммунолипосом. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):97–112. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-97-112

The Construction of Immunoliposomes (Review)

Maria V. Dmitrieva[1]✉, Ilya V. Yarosh[2], Ekaterina V. Sanarova[1], Anna V. Lantsova[1], Olga L. Orlova[1]

[1] FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia
[2] JSC "R-Pharm", 111/1, Leninsky pr-t, Moscow, 119421, Russia

✉ **Corresponding author:** Maria V. Dmitrieva. **E-mail:** dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Maria V. Dmitrieva – https://orcid.org/0000-0001-6740-5692; Ilya V. Yarosh – https://orcid.org/0000-0002-3347-9674; Ekaterina V. Sanarova – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137; Anna V. Lantsova – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023; Olga L. Orlova – https://orcid.org/0000-0002-4558-0083.

Received: 14.01.2022 **Revised:** 00.00.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Due to the discovery of antibodies (Ab) targeting molecule with high specificity to the ligand, the "magic bullet" concept has been successfully implemented with various immunoconjugated drugs. Since 1980, Ab conjugates with liposomes, i.e., immunoliposomes (ILs), have been widely investigated to improve the specificity and efficacy of drug therapy. This review is devoted to the characteristic of the basic structural units of ILs on the basis of data analysis of original and review articles on the topic from PubMed, ResearchGate and CyberLeninck databases.

© Дмитриева М. В., Ярош И. В., Санарова Е. В., Ланцова А. В., Орлова О. Л., 2022
© Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., Sanarova E. V., Lantsova A. V., Orlova O. L., 2022

Text. ILs are liposomes to which Ab, their fragments or other ligands are usually attached by a special linker. ILs are used to deliver antitumor, cardiovascular, antiviral, antiprotozoal drugs, genetic material, imaging molecules, etc. ILs can be derived from various phospholipids of both natural and synthetic origin, charged or neutral. The most widely used phospholipids in immunoliposomal construction are phosphatidylcholines. To increase the mechanical stability of the bilayer, sterols are introduced into the lipid composition. For selective liposome delivery, targeting ligands must be attached to the nanocarrier via the spacer arm of the PEG. Several types of end-group functionalized lipopolymers are used for this purpose, usually of the general formula X-PEG-LI, where X represents a fragment containing a reactive functional group – maleimide, biotin, cyanur, amine, etc. These lipid PEG-conjugates exhibit excellent amphiphilic properties and offer excellent advantages for the modification, formulation, and delivery of various drugs. The Ab used should enhance the accumulation of the liposomal drug in the target areas with minimal cross-reactivity with healthy tissues. Ready-made drugs based on monoclonal Ab, such as trastuzumab, cetuximab, panitumumumab, bevacizumab; commercial Ab intended for research purposes, and laboratory synthesized Ab and their fragments are used in the preparation of ILs. Ab can be attached to liposomes by two main methods: direct covalent conjugation and postinsertion.
Conclusion. The results of this study allowed us to summarize the variety of literature data on the composition of ILs and the possibility of using auxiliary components to achieve the goal in the development of the drug.

Keywords: immunoliposomes, pegylated liposomes, lipids, antibody, antigen, linker

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

Contribution of the authors. Maria V. Dmitrieva wrote the text of the article, collection and processing of literary data. Ilya V. Yarosh, Ekaterina V. Sanarova, Anna V. Lantsova made the collection and processing of literary data, translation. Olga L. Orlova carried out the research design, verification of the final version of the article.

For citation: Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., Sanarova E. V., Lantsova A. V., Orlova O. L. The construction of immunoliposomes. *Drug development & registration*. 2022;11(3):97–112. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-97-112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	антитело
ИЛ	иммунолипосома
ЛВ	лекарственное вещество
ЛС	лекарственное средство
ПЭГ	полиэтиленгликоль
Сульфо-NHS	N-гидроксисульфосукцинимид
ФЛ	фосфолипид
BS3	бис[сульфосукцинимидил]суберат
EDC	N-(3-диметиламинопропил)-N′-этилкарбодиимид
DTT	дитиотреитол
Mal-PEG-Chol	малеимидо-ПЭГ-холестерин
MCS-4	O-(3-холестерилоксикарбонил)пропионил-O′-m-малеимидобензоил-тетраэтиленгликоль
PDP	пиридилдитиолпропионат
pNP-PEG-PE	*n*-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-фосфоэтаноламин
SATA	N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат
SMPB	N-сукцинимидил-4-(*n*-малеимидофенил)-бутират
SPDP	N-гидроксисукцинимидный эфир 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты

ВВЕДЕНИЕ

В начале XX века химик и биолог Пауль Эрлих представил научную концепцию о создании «волшебной пули» – препарата, который при введении в организм больного сам найдет и убьет возбудителя болезни, не нанося ущерба пациенту. Идея подобного препарата предполагает, что одна часть молекулы должна состоять из фрагмента, распознающего и связывающего цель, а вторая должна обеспечивать терапевтическое действие на эту цель. С открытием антител (АТ), нацеливающей молекулы с высокой специфичностью к лиганду, концепция «волшебная пуля» была успешно реализована с различными иммуноцелевыми лекарственными веществами (ЛВ) – иммуноконъюгатами, включающих иммунотоксины, иммуноизотопы, АТ-химиотерапевтические конъюгаты и иммунонацеленные системы доставки ЛВ. И в последнее время достигнут значительный прогресс в области иммуноконъюгированных лекарственных средств (ЛС). Иммуномодификация ЛС оказалась очень многообещающим подходом, который значительно улучшил его целевое накопление в патологических участках, уменьшив при этом нежелательные побочные эффекты в здоровых тканях [1, 2].

С 1980 г. для повышения специфичности и эффективности лекарственной терапии стали широко исследоваться конъюгаты АТ с липосомами, т. е. иммунолипосомы (ИЛ). Доставка ЛВ с помощью ИЛ применяется для нацеливания на определенные участки

действия препарата, такие как мозг, легкие, раковые клетки или клетки иммунной системы; предотвращения клеточных механизмов лекарственной устойчивости, облегчения внутриклеточного проникновения и, следовательно, достижения более высоких уровней ЛВ в клетках-мишенях [3–5].

По сравнению с классическими иммуноконъюгатами ИЛ имеют несколько несомненных преимуществ. Во-первых, для избирательной доставки большого количества ЛВ к клеткам-мишеням посредством механизма рецепторопосредованной интернализации необходимо малое количество молекул лиганда на липосому – 10–20. В отличие от других иммуноконъюгатов, которые доставляют менее 10 молекул ЛВ или токсина на 1 молекулу АТ, ИЛ могут использоваться для переноса тысяч молекул ЛВ. Кроме того, предоставление множества нацеленных молекул на поверхности отдельных липосом может восстанавливать поливалентное связывание фрагментов моновалентных АТ и, следовательно, увеличивать их авидность связывания с антигенами-мишенями. Это может устранить необходимость в обширном реинжиниринге, например фрагментов scFv, для увеличения их валентности. Во-вторых, преимущество ИЛ заключается в возможности аддитивности или синергизма между сигнальными АТ, присутствующими на поверхности липосом, и ЛС, заключенным внутри липосомы. В-третьих, доставка ИЛ в опухолевые клетки облегчается не только за счет специфического распознавания антигена-мишени, но также за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза, который может дополнительно повышать внутриклеточные уровни ЛС и обходить механизмы лекарственной устойчивости, такие как внутриклеточные насосы оттока ЛС и изменения внутриклеточного перемещения ЛС [4, 6].

Данный обзор посвящен характеристике основных структурных единиц ИЛ на основе анализа данных оригинальных и обзорных статей по теме исследования из баз PubMed, ResearchGate и КиберЛенинка.

СТРУКТУРА ИММУНОЛИПОСОМ

ИЛ представляют собой липосомы, к которым обычно посредством специального линкера прикреплены АТ, их фрагменты или иные лиганды (рисунок 1). Различают 3 типа ИЛ [7, 8]:

- тип А – АТ непосредственно конъюгировано с обычной липосомой;
- тип В – АТ конъюгируется с пегилированной липосомой посредством линкера;
- тип С – АТ непосредственно прикреплено к дистальному терминальному концу полиэтиленгликоля (ПЭГ), который находится на поверхности липосомы.

Первоначально ИЛ были получены путем гидрофобного взаимодействия АТ, специфически модифицированных гидрофобными остатками на поверхности простой непегилированной липосомы. Однако,

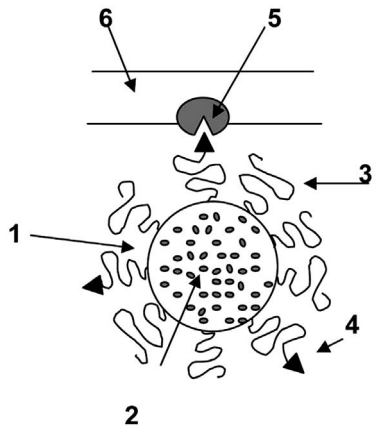


Рисунок 1. Схематическая структура ИЛ:

1 – липосома; 2 – ЛС; 3 – стерически защищающий полимер (обычно ПЭГ); 4 – нацеливающий лиганд, химически связанный с удаленными концами некоторых цепей привитого защитного полимера; 5 – специфический рецептор; 6 – клеточная мембрана (адаптировано по [9])

Figure 1. Schematic structure of immunoliposome:

1 – liposome; 2 – drug; 3 – sterically protecting polymer (usually PEG); 4 – targeting ligand chemically bound to the deleted ends of some chains with grafted protective polymer; 5 – specific receptor; 6 – cell membrane (adapted from [9])

несмотря на повышение эффективности нацеливания, ИЛ данного типа быстро выводились из крови и захватывались макрофагами, в первую очередь в печени. Более ранние попытки увеличить продолжительность циркуляции ИЛ были выполнены путем простой совместной иммобилизации АТ и ПЭГ на поверхности одной и той же липосомальной мембраны. Хотя молекулы ПЭГ могут стерически влиять на способность АТ распознавать антиген, было достигнуто значительное увеличение времени их циркуляции. Были разработаны многочисленные процедуры конъюгирования для прикрепления АТ к поверхности слоя ПЭГ в пегилированных липосомах так, что лиганд выходит за пределы плотного слоя ПЭГ, чтобы исключить стерические препятствия для связывания АТ с мишенью [1].

Вещества, доставляемые посредством иммунолипосом

В липосомы могут быть включены вещества различного происхождения – от низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот, и их комбинации, что позволяет применять их иммуноконъюгаты в диагностических, терапевтических и исследовательских целях. ИЛ используются в качестве носителей:

- противоопухолевых ЛВ, например, 5-фторурацила [10], рапамицина [11], панобиностата [12], оксалиплатина [13], паклитаксела [14], этопозида [15], винорелбина [16];

- сердечно-сосудистых ЛВ — морруата натрия [17], изорбида мононитрата [18], антитромбина [19], окиси азота [20];
- противопротозойных препаратов – пиронаридина и атоваквона [21];
- генетического материала – миРНК [22], плазмидной ДНК [23], антисмыслового олигонуклеотида [24];
- визуализирующих молекул – кальцеина [25], гашеных флуорофоров [26], радионуклеидов [27];
- препаратов других групп – допамина [28], цитиколина [29], мочевины [30], индинавира [31].

На диаграмме (рисунок 2) представлено соотношение групп препаратов, доставляемых с помощью ИЛ.

ИЛ широко изучались при лечении опухолей. В доклинических исследованиях ИЛ, направленные на EGFR, HER2, GD2 и CD19, продемонстрировали способность повышать активность нецелевых липосомальных составов. Сравнительные исследования тканевого распределения ИЛ и нецелевых липосом в опухолевых ксенотрансплантатах мышей показали сходное интратуморальное накопление полезной нагрузки препарата и отсутствие существенных различий в фармакокинетике и биораспределении. Однако детальный анализ образцов опухоли выявил значительное поглощение ИЛ опухолевыми клетками, тогда как нецелевые липосомы накапливались преимущественно в резидентных макрофагах опухоли. В клинических условиях ИЛ показали значительные преимущества. Во-первых, с точки зрения обеспечения эффектов препарата ИЛ не только снижают дозировку лекарств, но также могут уменьшать или предотвращать побочные эффекты у пациента. Во-вторых, ИЛ могут быть использованы для разработки новых медицинских подходов и повышения эффективности используемых гидрофильных (с низкой способностью проникать через мембрану) макромолекул. В-третьих, могут воздействовать на опухоли и легко контролировать дозировку ЛВ. В настоящее время на клинических исследованиях находятся несколько иммунолипосомальных форм доксорубицина, нацеленных на HER2 (MM-302), EGFR (anti-EGFR-IL-dox), на GAH-положительные раковые клетки желудка (MCC-465) и пролекарства доцетаксела, нацеленной на EphA2 (MM-310) (таблица 1) [18, 32–36].

Липиды, образующие липосомальный бислой

ИЛ могут быть получены из различных липидов. В липосомальных препаратах большую часть липидной композиции составляют фосфолипиды (ФЛ), которые могут происходить либо из природных источников (растительных и животных), либо могут быть синтезированы искусственно (таблица 2). Наиболее широко используемыми ФЛ в иммунолипосомальной конструкции являются фосфатидилхолины, поскольку являются основным компонентом клеточных мембран, что свидетельствует об их высокой биосовместимости. Фосфатидилхолины обладают большей гибкостью благодаря различным температурам плавления и содержат цвиттерионные (при физиологическом pH) головные группы [37, 38].

Для получения заряженных ИЛ в состав включают катионный липид, например, 1,2-диолеоилокси-3-триметиламмоний-пропан хлорид (DOTAP) [39], O,O′-димиристил-N-лизил глутамат DMKE [40], который необходим для эффективной конденсации нуклеиновых кислот, и его ассоциации с липосомами. Различия в структуре катионных липидов сильно влияют на их эффективность трансфекции и токсичность. Так сложноэфирная связь в молекуле DOTAP легко метаболизируется, поэтому его токсичность ниже, чем у других катионных липидов, и что, вероятно, обуславливает наиболее частое использование данного липида при получении липосом [37].

Большинство липосомальных препаратов содержат *холестерин* из-за его уникальных свойств влиять на поведение других липидов, входящих в состав бислоя. В редких случаях применяют производные холестерина (таблица 2). Данный липид показывает более высокое сродство и, следовательно, большую тенденцию к конденсации и образованию упорядо-

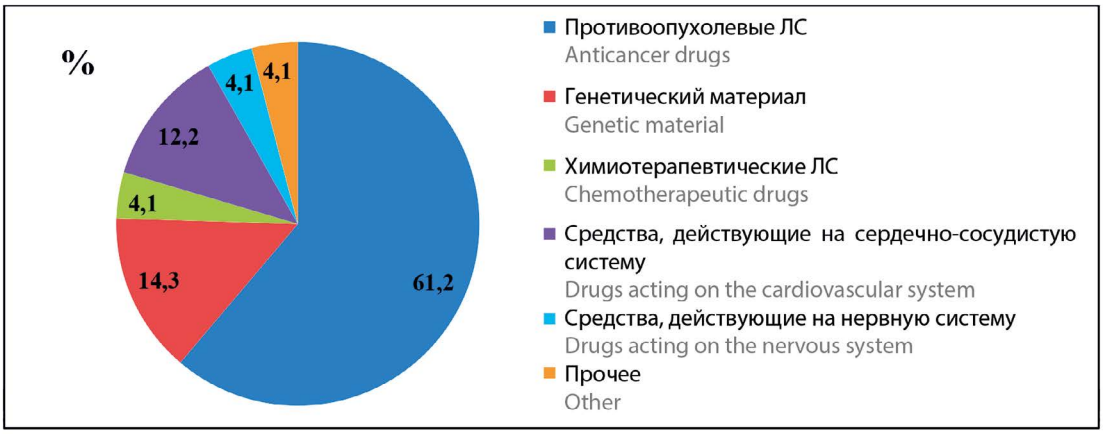


Рисунок 2. Распределение включаемых в ИЛ веществ по процентам

Figure 2. Percentage distribution of substances included in immunoliposomes

Таблица 1. Иммунолипосомальные препараты на клинических исследованиях

Table 1. Immunoliposomal preparations in clinical trials

Препарат The drug	Действующее вещество Active ingredient	Липидный состав Lipid composition	Антитело Antibody	Фаза Phase	Нозология Nosology	Локализация Localization
MCC-465	Доксорубицин Doxorubicin	• 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин; • холестерин; • 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид(ПЭГ-2000)] • 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; • cholesterol; • 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoetanolamine-N-[maleimide(PEG-2000)]	Фрагмент F(ab')2 человеческого моноклонального антитела GAH F(ab')2 fragment of the human monoclonal antibody GAH	1	Рак желудка Stomach cancer	Япония Japan
MM-302	Доксорубицин Doxorubicin	• гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин; • холестерин; • 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси-(ПЭГ-2000)] • hydrogenated soybean phosphatidylcholine; • cholesterol; • 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(PEG-2000)]	Трастузумаб Trastuzumab	2	Рак молочной железы Breast cancer	США USA
Anti-EGFR-ILs-dox (C225-ILs-dox)	Доксорубицин Doxorubicin	• 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин; • холестерин; • 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(ПЭГ-2000)]; • 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид(ПЭГ-2000)] • 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, • cholesterol, • 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(PEG-2000], • 1,2-distearoil-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(PEG-2000)]	Цетуксимаб Cetuximab	2	Рак молочной железы Breast cancer	Швейцария Switzerland
MM-310	Пролекарство доцетаксела Prodrug docetaxel	• яичный сфингомиелин, • холестерин, • ПЭГ-дистеароилглицерин (PEG-DSG) • egg sphingomyelin, • cholesterol, • PEG-distearoylglycerol (PEG-DSG)	Одноцепочечный фрагмент антиэфрина A2 (scFv EphA2) Single-chain fragment of antiefrin A2 (scFv EphA2)	1	Солидные опухоли Solid tumors	США USA

ченных бислоев к насыщенным ФЛ (например, DSPC), чем к ненасыщенным (DOPC). Холестерин повышает стабильность состава и снижает проницаемость бислоя для водорастворимых молекул, поскольку образует прочные водородные связи с соседними ФЛ и увеличивает общую конденсацию липидов [22, 37, 41, 42].

Липидный бислой ИЛ может быть образован одним или несколькими ФЛ как нейтрального, так и катионного типа. На основании анализа многообразия рецептур можно выделить несколько моделей липидной композиции липосом, которые отличаются числом используемых липидов и их соотношением:

- **«ФЛ»**, например, ИЛ доцетаксела на основе SPC [43];
- **«ФЛ + стерин»** – DPPC : холестерин (13 : 5) [2], HSPC : холестерин (2 : 1) [44];
- **«ФЛ1 + ФЛ2»** – POPC : DMKE (91 : 5) [40], DPPC : DPPG (10 : 3) [31];
- **«ФЛ1 + ФЛ2 + стерин»** – DOPC : сфингомиелин : холестерин (31,67 : 31,67 : 3) [45], HSPC : DSPC : холестерин (4,37 : 1 : 0,3) [46];
- **«ФЛ1 + ФЛ2 + ФЛ3 + стерин»** – EPC : DPPC : DPPG : холестерин (27 : 42 : 8 : 15) [47].

Линкеры

Линкеры или якоря представляют собой ключевой компонент иммуноконъюгатов. «Идеальный» линкер должен не только обеспечивать стабильность во время циркуляции в крови, но также обеспечивать быстрое высвобождение эффекторной молекулы в зоне нацеливания. Различают 2 типа линкеров – не-

Таблица 2. Структурообразующие и стабилизирующие липиды бислоя ИЛ

Table 2. Structure-forming and stabilizing lipids of the immunoliposome bilayer

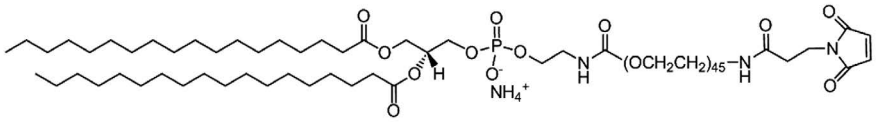
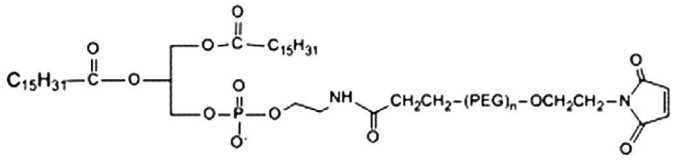
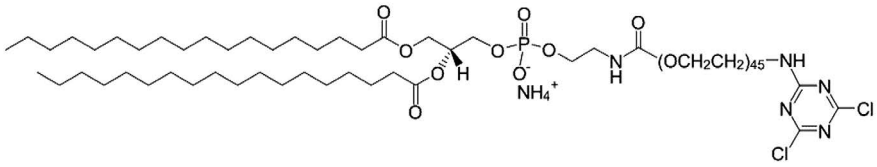
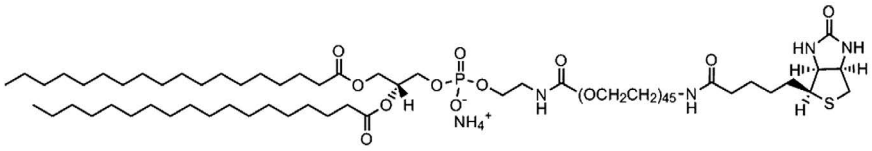
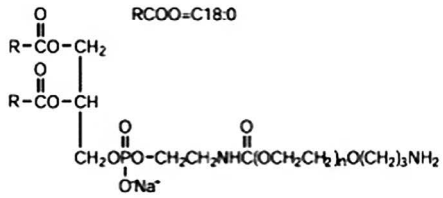
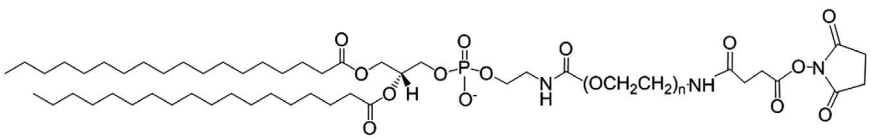
Класс Class	**Группа** Group	**Примеры** Examples	**Концентрация в бислое, моль %** Concentration in bilayer, mol %
Фосфолипиды Phospholipids	Природные, в том числе гидрогенизированные Natural, including hydrogenated	EPC – яичный фосфатидилхолин Egg phosphatidylcholine	27–75
		SPC – соевый фосфатидилхолин Soy phosphatidylcholine	37–100
		HSPC – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин Hydrogenated soybean phosphatidylcholine	55–66
	Синтетические Synthetic	DPPC – 1,2-дипальмитоил-s*n*-глицеро-3-фосфохолин 1,2-dipalmitoyl-s*n*-glycero-3-phosphocholine	42–75
		DOPC – 1,2-диолеоил-s*n*-глицеро-3-фосфохолин 1,2-dioleoyl-s*n*-glycero-3-phosphocholine	31–75
		DSPC – 1,2-дистеароил-s*n*-глицеро-3-фосфохолин 1,2-distearoyl-s*n*-glycero-3-phosphocholine	15–70
		POPC – 1-пальмитоил-2-олеоил-s*n*-глицеро-3-фосфохолин 1-palmitoyl-2-oleoyl-s*n*-glycero-3-phosphocholine	5–93
		DOPE – 1,2-диолеоил-s*n*-глицеро-3-фосфоэтаноламин 1,2-dioleoyl-s*n*-glycero-3-phosphoethanolamine	48–50
		DPPG – 1,2-дипальмитоил-s*n*-глицеро-3-фосфо-рац-глицерол 1,2-dipalmitoyl-s*n*-glycero-3-phospho-raz-glycerol	8–22
		DSPG – 1,2-дистеароил-s*n*-глицеро-3-фосфо-*rac*-глицерол 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-*rac*-glycerol	4–5
	Катионные Cationic	DOTAP – 1,2-диолеоилокси-3-триметиламмоний-пропан хлорид 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane chloride	40–50
		DMKE – O,O′-димиристил-N-лизил глутамат O,O′-dimyristyl-N-lysyl glutamate	5–48
	Сфинголипиды Sphingolipids	Сфингомиелин – N-ацил-сфингозин-1-фосфохолин N-acyl-sphingosine-1-phosphocholine	31–58
Стерины Sterines		Холестерин Cholesterol	4–48
		Холестерилгемисукцинат Cholesterylhemisuccinate	48–49
		3β-[N-(N′,N′-диметиламиноэтан)карбамоил] холестерин 3β-[N-(N′,N′-dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol	48–49

восстанавливаемые и восстанавливаемые. Невосстанавливаемые линкеры, такие как тиоэфир, стабильны в химической или ферментативной среде и высвобождают терапевтическую молекулу только после полной деградации АТ в лизосоме. Гидразоновые, пептидные и дисульфидные связи являются примерами восстанавливаемых линкеров, которые могут расщепляться внутриклеточно или внеклеточно в условиях пониженного pH или под действием гидролитических ферментов. Линкеры обычно составляют в липосомах 5–10 % от общего количества липидов [1, 48]. Примеры типов связывания липосом с линкером представлены на рисунке 3.

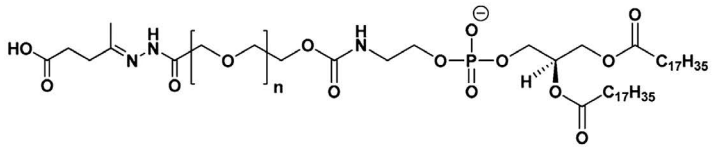
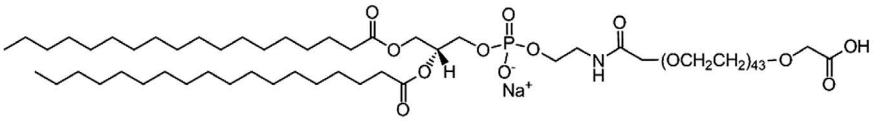
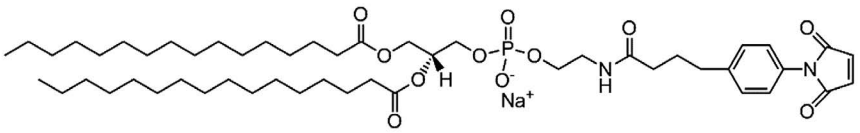
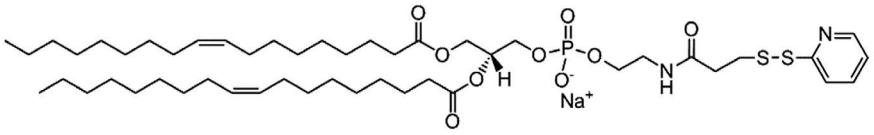
Для достижения селективной доставки с помощью пегилированных липосом нацеливающие лиганды должны быть прикреплены к наноносителю через спейсерное плечо ПЭГ, так что лиганд выходит за пределы плотной оболочки ПЭГ, благодаря чему может беспрепятственно связываться с целевыми рецепторами. Лиганды прикрепляются к активированным, контактирующим с водой концам привитой липосомой полимерной цепи. Для этой цели используют несколько типов функционализированных концевыми группами липополимеров обычно общей формулы X-PEG-LI, где X представляет собой фрагмент, содержащий реакционноспособную функциональную группу; LI – липид. Большинство функционализированных концевыми группами ПЭГ-липидов было синтезировано из гетеробифункциональных производных ПЭГ, содержащих гидроксильные и карбоксильные или аминогруппы (таблица 3). Пегилированные ФЛ имеют более длительное время циркуляции крови и более высокую стабильность для инкапсулированных лекарств. Эти липидные ПЭГ-конъюгаты демонстрируют превосходные амфифильные свойства и предлагают превосходные преимущества для модификации, формулирования и доставки ЛС с малыми и большими молекулами [49].

Таблица 3. Наиболее используемые линкеры при получении ИЛ

Table 3. The most used linkers in obtaining immunoliposomes

Линкер Linker	**Формула** Formula	**Концентрация в липосоме, мол%** Liposome concentration, mol%
Mal-PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(PEG)-2000] (ammonium salt)	0,01–20
Mal-PEG-DPPE	 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (PEG)-2000] (ammonium salt)	1,7–6,3
Cya-PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[цианур (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[cyanur(PEG)-2000] (ammonium salt)	5
Biotin-PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[биотинил (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(PEG)-2000] (ammonium salt)	0,01
NH2-PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(PEG)-2000] (ammonium salt)	0,6–4,4
NHS-PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[сукцинимидил (ПЭГ)-2000] 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[succinimidyl (PEG)-2000]	–

Окончание таблицы 3

Линкер Linker	**Формула** Formula	**Концентрация в липосоме, мол%** Liposome concentration, mol%
Hz-PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[гидразид(ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[hydrazide(PEG)-2000] (ammonium salt)	1,7–2,5
Carboxylic Acid–PEG-DSPE	 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбокси (ПЭГ)-2000] (натриевая соль) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(PEG)-2000] (sodium salt)	0,2–24,2
MPB-PE	 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[4-(п-малеимидофенил) бутирамид] (натриевая соль) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide] (sodium salt)	1,75–8
PDP-PE	 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[3-(2-пиридилдитио) пропионат] (натриевая соль) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[3-(2-pyridyldithio)propionate] (sodium salt)	5,26

Mal-PEG-DSPE[1] и ***Mal-PEG-DPPE***[2] являются одними из реактивных производных пегилированного ФЛ, способных реагировать с сульфгидрильными группами (тиол, -SH). DSPE (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин) – 18-углеродный ФЛ и DPPE – 16-ти углеродный насыщенный ФЛ обладают высокой гидрофобностью, а ПЭГ, с другой стороны, обеспечивает хорошую гидрофильность и растворимость в воде. Функционализированные малеимидом линкеры обладают превосходной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильным/тиоловым группам, полученным из различных молекул, поскольку малеимидная группа более специфична для остатков SH, чем другие реактивные группы. Реакция между тиолом и малеимидными группами является одной из наиболее полезных и эффективных реакций в химии биоконъюгатов. Она протекает при pH, близком к нейтральному, при температуре окружающей среды, в течение короткого периода времени и часто приводит к удовлетворительному выходу конъюгатов, даже при относительно низких концентрациях реагирующих веществ. Хорошо известно, что частота встречаемости SH-групп в АТ или белках ограничена по сравнению с другими функциональ-

[1] DSPE PEG Maleimide, DSPE-PEG-MAL. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/Maleimide-PEG/Maleimide-PEG-DSPE/DSPE-PEG2000-Maleimide-2k.htm. Accessed: 26.12.2021.

[2] DPPE PEG Maleimide, DPPE-PEG-Mal. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/Maleimide-PEG/DPPE-PEG-Maleimide/DPPE-PEG2000-Maleimide.htm. Accessed: 26.12.2021.

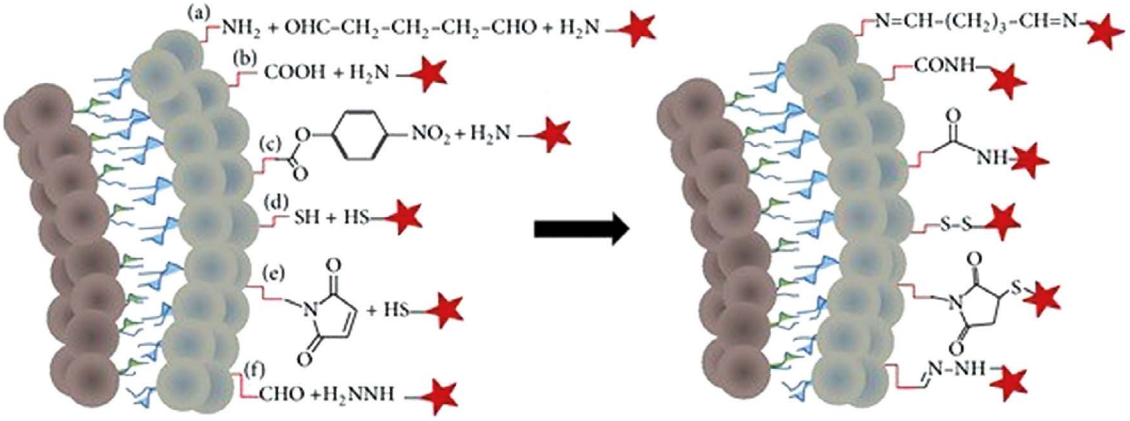


Рисунок 3. Схематическое изображение поперечного сечения липосомального бислоя, содержащего функциональные группы, для иллюстрации сшивания первичных аминов глутаральдегидом (a), образования карбониламинной связи (b), образования амидной связи в результате реакции п-нитрофенилкарбонила с первичным амином (c), образование дисульфидной связи (d), образование тиоэфирной связи в результате реакции присоединения малеимида к тиолу (e) и образование гидразоновой связи (f). Связанные лиганды обозначены красными звездочками (адаптировано по [48])

Figure 3. Schematic representation of the cross section of a liposomal bilayer containing functional groups to illustrate (a) glutaraldehyde crosslinking of primary amines, (b) carbonylamine bond formation, (c) amide bond formation resulting from the reaction of p-nitrophenylcarbonyl with primary amine, (d) disulfide bond formation, (e) thioether bond formation resulting from the attachment of maleimide to thiol, and (f) hydrazone bond formation. Binding ligands are indicated by red asterisks (adapted from [48])

ными группами, такими как амины или карбоксилаты. Использование SH-групп может модифицировать определенные участки в молекуле-мишени и такая модификация значительно повышает способность поддерживать активность после конъюгации, особенно в чувствительных белках, таких как ферменты. Таким образом, малеимид представляется особенно подходящим соединением для смешивания двух макромолекулярных образований. Mal-PEG-DSPE является наиболее часто используемым линкером (около 60–65 % рецептур) для конъюгирования АТ, пептидов или других лигандов к поверхности липосом и других липидных наночастиц. Однако стоит отметить, что использование модифицированного малеимидом липида, включенного в липосомы, мешает процедуре загрузки ЛВ. Также известно, что малеимид подвергается постепенной деградации в условиях, используемых во время приготовления липосом, определения размера и загрузки ЛВ. Поскольку малеимидная группа медленно гидролизуется в водном растворе, важно выполнить конъюгацию АТ сразу после приготовления липосом, не давая ему возможности подвергнуться каким-либо побочным реакциям. Для блокирования свободных малеимидных групп ИЛ инкубируют с 0,5–1,0 мМ L-цистеином [14, 50–53].

Альтернативным линкером с малеимидной группой является ***MPB-PE***, который в качестве фосфолипидной части содержит фосфоэтаноламин двух видов, различающихся жирными кислотами – пальмитиновой (16:0 MPB-PE) или олеоиновой (18:1 MPB-PE), соединенный с малеимидной группой через короткий бутириловый спейсер. Для облегчения конъюгации с MPB-липосомами АТ активируют, например, N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-(2-пиридилдитио) пропионовой кислоты (SPDP) и затем восстанавливают дитиотреитолом (DTT). Также некоторые авторы указывают на использование производных янтарной кислоты для введения экзогенных тиоловых групп. Таким образом, необходимо спровоцировать реакцию донора группы -SH донора, такого как N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) с АТ, который является более специфичным SH-реактивом. В этом случае атом серы вводится в виде тиоэфира, который легко разблокируется с помощью гидроксиламина. Эфирная терминальная группа NHS SATA вступает в реакцию с аминогруппами АТ с образованием стабильной амидной связи. Модифицированное АТ содержит защищенную SH-группу, благодаря чему не подвергается деградации и может длительно храниться. Поскольку присутствие этого амина не мешает последующему образованию дисульфидных и тиоэфирных связей, эти две реакции можно проводить в одном и том же сосуде без необходимости удаления гидроксиламина перед добавлением белка в липосому. Деацетилированный комплекс инкубируется с липосомами и, таким образом, функционализируется для распознавания и присоединения к мишени [25, 53–57].

PDP-PEG-DSPE[1] – производное пиридилдитиопропионата (PDP), соединенного с пегилированным DSPE и способное с высокой эффективностью реагировать со свободными тиоловыми группами с обра-

[1] DSPE PEG PDP. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/DSPE-PEG/DSPE-PEG-PDP.htm. Accessed: 26.12.2021.

зованием дисульфидной связи, которая может быть расщеплена восстановительными реагентами. PDP-PEG-DSPE легко включают в липосомы во время их формирования и пиридилдитиогруппы восстанавливают добавлением DTT. Для присоединения АТ к полученным липосомам их также тиолируют путем инкубирования при комнатной температуре с SPDP или N-сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)-бутиратом (SMPB). Таким образом, при использовании в качестве линкера соединения PDP-PEG-PE малеимидная группа прикрепляется к АТ, а не к поверхности липосомы, как в методах получения ИЛ с MPB-PE или Mal-PEG-DSPE. Инкубация везикул с малеимид-АТ приводит к эффективной конъюгации, даже когда содержание PDP-PEG-DSPE в липосомах ниже 1 моль%. Этот метод реализует многие из критериев, которые были желательны для идеальных ИЛ, включая простоту, высокую эффективность конъюгации, возможность достижения большого диапазона плотностей АТ на поверхности липосомы, эффективную загрузку ЛВ и медленную скорость его высвобождения, сохранение связывания с мишенью. Недостатком этого метода является то, что свободные тиоловые группы могут реагировать между собой с образованием дисульфидных связей, приводящих к перекрестному сшиванию молекул АТ или ИЛ, дополнительно способствуя их агрегации и более быстрому выведению из кровотока. Хотя присутствие ПЭГ служит для ингибирования агрегации в значительной степени. Кроме того, случайное введение тиоловых групп в молекулу АТ может влиять на биологические свойства молекулы, что приводит к нарушению связывания АТ с его рецептором, активации рецептора и/или эндоцитозу [6, 52, 58].

Cyanur-PEG-DSPE представляет собой функционализированный конъюгированным цианурхлоридом конъюгат «ПЭГ-ФЛ», используемый для присоединения пептидов, АТ и т. д. в мягких основных условиях. Белки могут быть связаны с этим мембранным якорем без необходимости предварительной дериватизации. Цианурхлорид представляет собой трехфункциональный реагент с четкой градацией реакционной способности. Первые два хлоридных замещения могут быть достигнуты при реакции с нуклеофилами в слабощелочных условиях, в следующих состояниях реакционная способность третьего хлорида сильно снижена. Хлорид циануровой кислоты подходит для связывания концевых гидроксильных групп ПЭГ с аминогруппами белков для получения систем нацеливания липосомальных ЛС, при этом результаты связывания сильно зависят от pH. При нейтральном pH 7 способность связывания АТ практически отсутствует. Повышение основных условий до pH 8,8 приводит к резкому увеличению эффективности связывания. pH 8,8 является оптимальным для реакции, поскольку более сильные щелочные условия показывают резко сниженные результаты связывания, что следует отнести к гидролитическому разложению хлорида циануровой кислоты в сильнощелочной среде [45, 59, 60].

Biotin-PEG-DSPE[1] является одним из функциональных фосфолипидных ПЭГ-производных, содержащий биотин и DSPE. Биотин – это биологически активная молекула, обладающая высокой аффинностью к авидину или стрептавидину. Система «биотин-стрептавидин» широко используется для обнаружения и очистки белков, нуклеиновых кислот и многих других биомолекул. Модифицированный биотином линкер PEG-DSPE может быть включен в липосомы и другие наночастицы и, таким образом, использован для нацеливания и обнаружения авидина или стрептавидина, а также конъюгированных с ними субстратов. Для конъюгации АТ связывают с биотиновым линкером через стрептавидин, например, из *Streptomyces avidinii*. В нековалентном биотин-авидиновом методе авидин с его четырьмя сайтами связывания выполняет функцию перекрестного связывания биотинилированных АТ и биотинилированных липидов в липосомальной мембране [50, 60].

Амин-PEG-DSPE (NH2-PEG-DSPE)[2] является производным пегилированного ФЛ, содержащий реактивную первичную аминогруппу на конце ПЭГ. Для прикрепления АТ предварительно аминогруппу линкера активируют по методу Курниса посредством обработки липосом гомобифункциональным сшивающим агентом бис[сульфосукцинимидил] субератом (BS3) и последующей очистки полученного конъюгата от не вступившего в реакцию BS3 с помощью гель-фильтрационной хроматографии. В альтернативном методе повышения реактивности АТ к группе -NH2 к АТ добавляют 0,1 М раствор периодата натрия и инкубируют в защищенном от света месте для образования реактивных групп, например альдегидных [12, 61].

Hydrazide-PEG-DSPE[3] – производное ПЭГ-ФЛ с карбонильной группой, которое может реагировать с альдегидными или кетоновыми группами, полученными из полисахаридов или гликопротеинов. ПЭГ между DSPE и гидразидом обеспечивает лучшую растворимость в воде, гибкую структуру линкера и повышенную стабильность. Гидразид легко вступает в реакцию с альдегидной группой, образуя стабильную гидрозонную связь, которая более стабильна, чем основание Шиффа, образующееся между альдегидом и аминогруппой. Гидразоновые связи – одна из эффективных кислотно-расщепляемых связей, используемых для связывания ЛВ с целевыми АТ в медицинской биотехнологии. Гидразоновые связи стабильны

[1] DSPE PEG Biotin. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/DSPE-PEG-Biotin-2k.htm?keyword=DSPE%20PEG%20Biotin&category_id=109&model=1. Accessed: 26.12.2021.

[2] DSPE PEG Amine, DSPE-PEG-NH2. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/DSPE-PEG/DSPE-PEG-NH2.htm. Accessed: 26.12.2021.

[3] Hydrazide PEG DSPE. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/Hydrazide-PEG/DSPE-PEG-Hydrazide/Hydrazide-PEG-DSPE-2k.htm. Accessed: 26.12.2021.

в физиологической среде, но быстро диссоциируют в кислой среде (например, лизосомах) клетки. Триггерное высвобождение лекарств в кислой среде полезно, поскольку эта среда хорошо коррелирует с окружающей средой раковых тканей, а применение чувствительных к кислоте липосом (pH-липосомы) оказалось эффективным при лечении рака. Реакция между гидразидом и альдегидом обеспечивает быструю и эффективную конъюгацию фосфолипидов с углеводами, гликопротеинами, АТ и ферментами. Конъюгирование иммуноглобулинов с использованием специфической реакционной способности их окисленных (периодатом натрия) углеводных остатков, как известно, дает активные аддукты. Это объясняется тем, что конъюгация происходит сайт-специфично через олигосахаридные фрагменты, расположенные на Fc-части молекулы гликопротеина, далеко от сайтов связывания антигена [54, 62–64].

COOH-PEG-DSPE[1] является одним из конъюгатов ПЭГ с ФЛ, которые могут реагировать с первичными аминогруппами. Процедура сочетания включает двухстадийную карбоимидную реакцию: после очистки липосом карбоксильную группу активируют добавлением N-(3-диметиламинопропил)-N′-этилкарбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимида (сульфо-NHS), смесь инкубируют при комнатной температуре и затем ультрацентрифугируют или хроматографируют для удаления избытка сшивающих реагентов. Промежуточный продукт на основе сложного эфира сульфо-NHS, реагирующего с амином, обладает достаточной стабильностью, чтобы обеспечить связывание с АТ [65, 66].

Также было введено другое амфифильное реакционноспособное производное ПЭГ ***п-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-фосфоэтаноламин (pNP-PEG-PE)***, который легко адсорбируется на гидрофобных наночастицах или встраивается в липосомы и мицеллы через свой фосфолипидный остаток, и легко связывает соединение, содержащее аминогруппу, через свою подвергающуюся воздействию воды группу pNP [49].

Кроме фосфолипидсодержащих линкеров для конъюгирования АТ с липосомальной поверхностью также используют соединения из семейства связывающих липидов на основе холестеринового якоря, различающихся полярностью, длиной цепи спейсерной единицы и составом (таблица 4). Холестерин, являясь основным компонентом биологических мембран, дешевле липидов, используемых для синтеза линкеров на основе ПЭГ, поэтому является привлекательной альтернативой DSPE или DPPE в качестве эффективного липидного якоря для получения ИЛ. Например, Kley et al. для прикрепления АТ против рецептора, содержащий домен вставки киназы, использовали O-(3-холестерилоксикарбонил)пропионил-O′-m-малеимидобензоилтетраэтилен-гликоль (***MCS-4***), который легко включается в бислои липосом и не влияет на их размер. При этом исследования по оптимизации процесса соединения показали, что тиолирование белков с помощью SATA или иминотиолана приводит к одинаковой эффективности конъюгации, и реакция протекает не более 2–4 ч. В другом исследовании для прикрепления цетуксимаба (C225) к липосомам использовали производное малеимидо-ПЭГ-холестерин (Mal-PEG-Chol). Синтез Mal-PEG-Chol из легкодоступных исходных материалов прост и эффективен. Группа малеимида в производном холестерина оказалась особенно полезной для конъюгации с фрагментами Fab›, которые содержат свободную тиольную группу. Также, было установлено, что как АТ, так и их фрагменты могут быть легко связаны с Mal-PEG-Chol, а полученные биоконъюгаты АТ- или Fab›-PEG-Chol эффективно включены в предварительно сформированные липосомы с получением ИЛ постинсерционным методом [57, 67–69].

Антитела в иммунолипосомальной конструкции

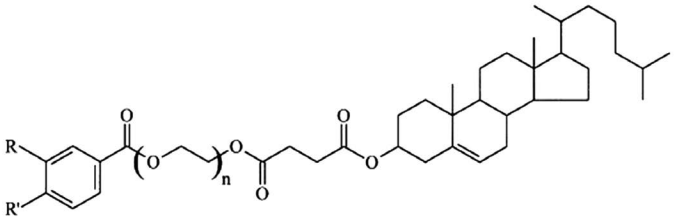
Несомненно, наиболее важным компонентом иммуноконъюгатов являются ***АТ***. Используемое АТ должно усиливать накопление липосомального ЛС в целевых областях с минимальной перекрестной реактивностью со здоровыми тканями. Также может наблюдаться синергическая активность при сочетании сигнальных АТ с комбинациями противоопухолевых препаратов. На сегодняшний день большинством мишеней, вовлеченных в клинические испытания, являются антигены, ассоциированные с опухолью. Сюда входят антигены, сверхэкспрессированные в В-клетках (например, CD20, CD22, CD40, CD79), Т-клетках (CD25, CD30), клетках карциномы (HER2, EGFR, EpCAM, EphB2, PSMA, Cripto), эндотелиальных клетках (эндоглин), клетках стромы (белок, активированный фибробластами) и антигены сосудистой сети опухоли [1]. При приготовлении ИЛ используют готовые лекарственные препараты на основе моноклональных АТ, например, Трастузумаб®/Герцептин® [46, 70, 71], Цетуксимаб®/Эрбитукс® [10, 40, 72], панитумумаб [27], бевацизумаб [27]; коммерческие АТ, предназначенные для исследовательских целей [17, 23, 73], и синтезированные в лабораторных условиях АТ и их фрагменты [14, 18, 41].

Наряду с АТ для адресной доставки ЛВ используются нацеливающие пептиды, которые связываются со своим опухолевым антигеном-мишенью с высокой специфичностью. Аффинность связывания целевого пептида может быть такой же сильной, как и у АТ, и определяется последовательностью пептида. Нацеливающий пептид относительно стабилен и имеет более низкую иммуногенность в отличие от АТ, а также его легко конъюгировать с липосомами, поскольку является небольшой молекулой. Кроме того, производство АТ и их фрагментов, которые требуют экспрессии и очистки в биологических системах,

[1] DSPE PEG Acid, DSPE-PEG-COOH. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/DSPE-PEG/DSPE-PEG-COOH/DSPE-PEG2000-COOH.htm. Accessed: 26.12.2021.

Таблица 4. Общая формула и примеры соединений из семейства связывающих липидов на основе холестеринового якоря (адаптировано по [57, 69])

Table 4. General formula and examples of compounds from the cholesterol anchor lipid binding family (adapted from [57, 69])



Название соединения Name	Вставка Spacer	n	R	R’
m-MCS-1	Этиленгликоль Ethylene glycol	1	Малеимид Maleimido	H
m-MCS-4	Тетраэтиленгликоль Tetraethylene glycol	4	малеимид Maleimido	H
p-MCS-4	Тетраэтиленгликоль Tetraethylene glycol	4	H	Малеимид Maleimido
m-MCS-9	ПЭГ-400 PEG-400	9 (8–10)	Малеимид Maleimido	H
m-MCS-22	ПЭГ-1000 PEG-1000	22 (20–25)	Малеимид Maleimido	H

намного дороже, чем производство небольших лигандов и пептидов, которые могут быть синтезированы химическим путем, например, наиболее часто используемым методом твердофазного пептидного синтеза [74].

При разработке системы доставки необходимо учитывать некоторые вопросы [9]:

1. Лиганд (АТ, пептид или углевод), прикрепленный к поверхности носителя, может увеличивать скорость его поглощения ретикулоэндотелиальной системой, несмотря на присутствие стерически защищающих веществ (ПЭГ).
2. Несущие лиганд долго циркулирующие наноносители могут способствовать развитию нежелательного иммунного ответа (как было показано с повышением уровня антилипосомальных АТ), степень которого зависит от типа лиганда (небольшие пептиды или фрагменты АТ менее иммуногенны, чем целая молекула IgG) и липосомального состава.
3. Количество лиганда, прикрепленного к носителю, может иметь решающее значение для обеспечения успешного связывания с мишенью при сохранении расширенной циркуляции носителя.

АТ могут быть прикреплены к липосомам двумя основными способами – ковалентной конъюгации и постинсерционным методом.

Постинсерционный метод (метод «после вставки») включает связывание лигандов с концом ПЭГ-липидных производных в мицеллярной фазе с последующим зависящим от времени и температуры переносом связанных с лигандом ПЭГ-липидов в бислои, предварительно сформированных липосом с ЛС, посредством простой инкубации (рисунок 4). Это привлекательно с точки зрения производства, поскольку в уже готовые липосомы можно вставить широкий спектр лигандов, включая АТ, фрагменты АТ, пептиды, углеводы и т. д. Также это привлекательно с клинической точки зрения, потому что липосомы после вставки могут быть адаптированы с учетом как лекарственной чувствительности конкретного злокачественного новообразования, так и его рецептора или экспрессии антигена, что приводит к улучшению терапевтического эффекта. Получаемые конструкции удовлетворяют многим установленным критериям «идеальных иммунолипосом». Техника проста, может быть достигнут соответствующий уровень включения стабильного лиганда и метод не влияет на характеристики нагрузки или высвобождения ЛС из липосом [75].

Ковалентное конъюгирование АТ и конца ПЭГ, входящего в состав линкера, осуществляется за счет образования стабильной ковалентной связи, например через тиоэфир, амид, гидразон или другие. При этом АТ должно быть дериватизировано, чтобы быть связанным с липидными фрагментами. В одном из наиболее часто используемых методов дериватизации используется реагент Траута (2-иминотиолан), который генерирует тиоловые группы в АТ, обеспечивая ковалентную связь посредством реакции с малеимидом в линкере, включенного в липосомальный бислой (рисунок 5). Количество связавшихся АТ с липосомами зависит в основном от трех факторов: молярного процента линкера, включенного в липосомы; концентрации АТ и соотношения концентраций линкера и АТ в инкубационной смеси. Доказано, что количество АТ, связанного с липосомами, повышается с увеличением количества реактивных групп на поверхности везикул и концентрации АТ [76, 77].

Кроме того для прикрепления АТ могут быть использованы и другие подходы. Например, некоторые

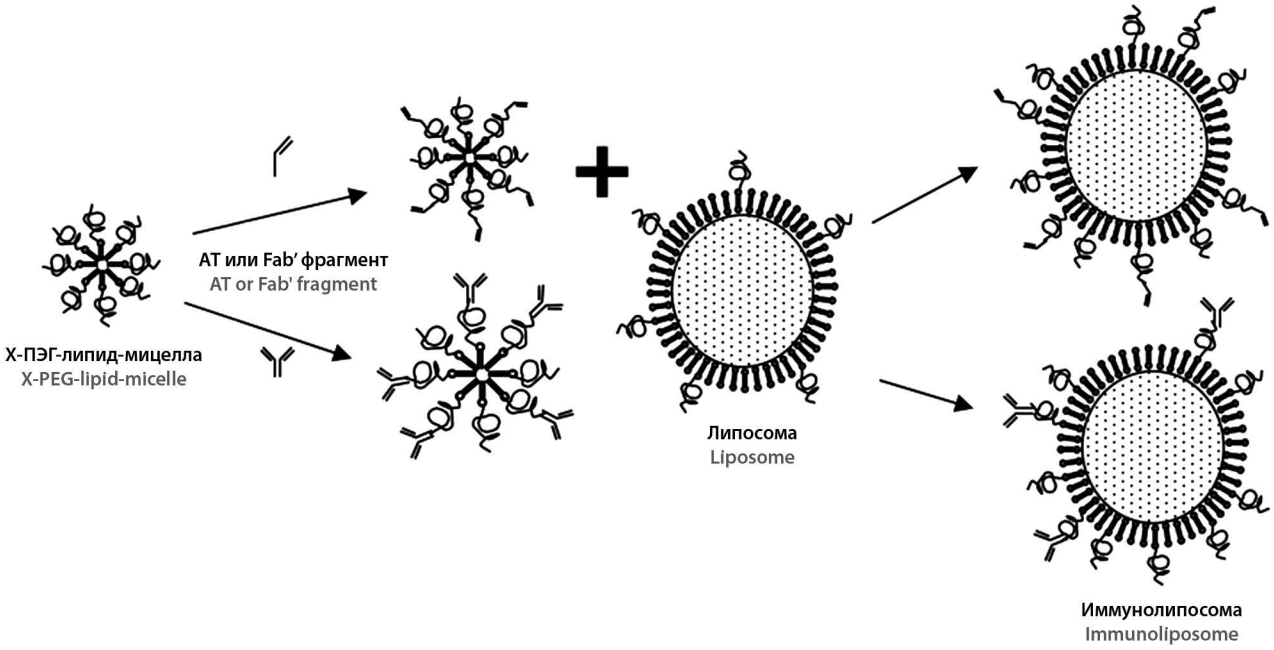


Рисунок 4. **Схема получения ИЛ при использовании постинсерционного метода прикрепления АТ (адаптировано по [68])**

Figure 4. **Scheme of obtaining immunoliposomes using postinsertion method of antibody attachment (adapted from [68])**

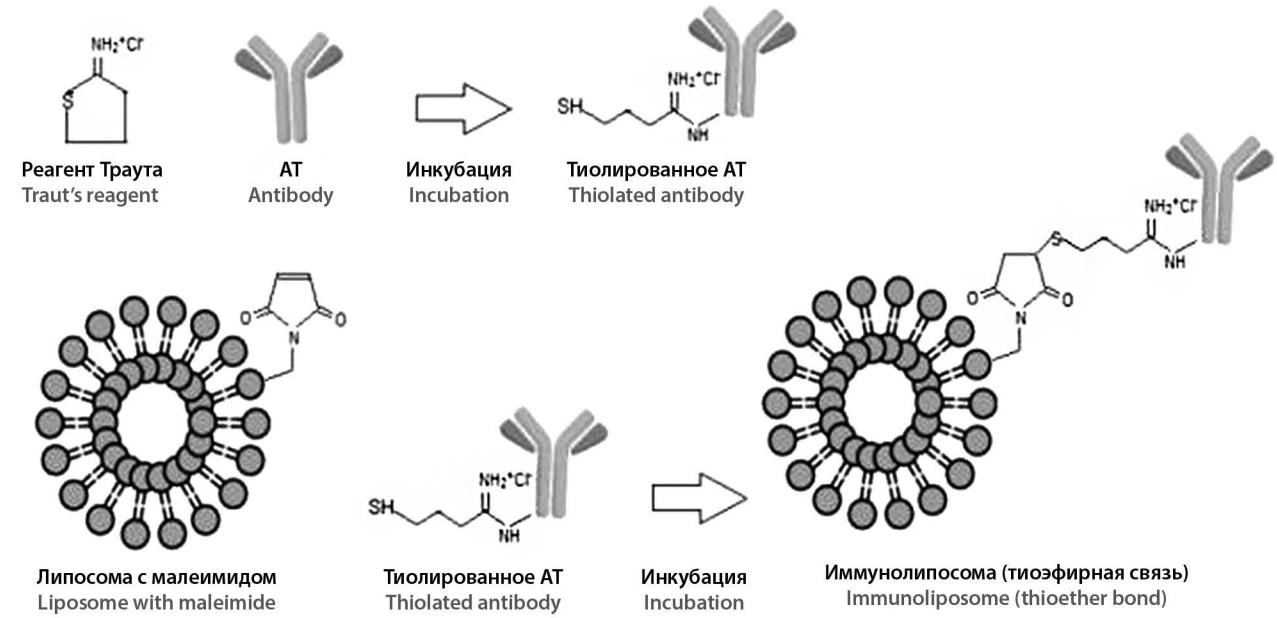


Рисунок 5. **Тиолирование АТ и схема получения ИЛ методом конъюгирования (адаптировано по [76])**

Figure 5. **Thiolation of antibody and scheme of obtaining immunoliposomes by conjugation (adapted from [76])**

авторы предложили инкубировать липосомальную дисперсию с АТ в среде 25 % раствора глутарового альдегида при температуре 20–25 °С в течение 10 мин. Затем избыток глутаральдегида удаляют диализом солевым раствором. Либо отдельно проводят инкубацию липосом с глутаральдегидом и после очистки в дисперсию вводят АТ [18, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модификация поверхности липосом путем прикрепления АТ или его фрагментов является рациональным подходом для улучшения целевого накопления ЛВ в патологических очагах с одновременной минимизацией его нежелательных побочных эффектов в здоровых тканях. ИЛ представляют уникаль-

ный класс системы доставки ЛВ, в структуре которого можно выделить нескольких основных частей – собственно липосома, линкер и нацеливающий лиганд или АТ. Именно выбор данных составляющих определяет фармацевтические и фармакокинетические характеристики и эффективность применения иммунолипосомального препарата. Результаты проведенного исследования позволили обобщить многообразие литературных данных о составе вспомогательных компонентов ИЛ и возможности их использования для достижения поставленной цели при разработке препарата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Koshkaryev A., Sawant R., Deshpande M., Torchilin V. Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):24–35. DOI: 10.1016/j.addr.2012.08.009.
2. Opimah I. V. The Magic Bullet, or the birth of chemotherapy. *Medical Technologies. Assessment and Choice.* 2014;1:88–91. (In Russ.)
3. Cho H., Stuart J. M., Magid R., Danila D. C., Hunsaker T., Pinkhassik E., Hasty K. A. Theranostic immunoliposomes for osteoarthritis. *Nanomedicine.* 2014;10(3):619–627. DOI: 10.1016/j.nano.2013.09.004.
4. Janthur W. D., Cantoni N., Mamot C. Drug conjugates such as Antibody Drug Conjugates (ADCs), immunotoxins and immunoliposomes challenge daily clinical practice. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):16020–16045. DOI: 10.3390/ijms131216020.
5. Ng H. L., Lu A., Lin G., Qin L., Yang Z. The potential of liposomes with carbonic anhydrase IX to deliver anticancer ingredients to cancer cells in vivo. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):230–255. DOI: 10.3390/ijms16010230.
6. Sapra P., Allen T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res*. 2003;42(5):439–462. DOI: 10.1016/s0163-7827(03)00032-8.
7. Shapira J., Budman D., Bradley T., Gralla R. Evolving lipid-based delivery systems in the management of neoplastic disease. *Oncol. Rev.* 2009;3:113–124.
8. Riaz M. K., Riaz M. A., Zhang X., Lin C., Wong K. H., Chen X., Zhang G., Lu A., Yang Z. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: a review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):195. DOI: 10.3390/ijms19010195.
9. Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):431–444. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.026.
10. Petrilli R., Eloy J. O., Lopez R. F., Lee R. J. Cetuximab immunoliposomes enhance delivery of 5-FU to skin squamous carcinoma cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(2):301–308. DOI: 10.2174/1871520616666160526110913.
11. Gholizadeh S., Visweswaran G. R. R., Storm G., Hennink W. E., Kamps J. A. A. M., Kok R. J. E-selectin targeted immunoliposomes for rapamycin delivery to activated endothelial cells. *Int J Pharm*. 2018;548(2):759–770. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.027.
12. Jose G., Lu Y. J., Hung J. T., Yu A. L., Chen J. P. Co-delivery of CPT-11 and panobinostat with anti-GD2 antibody conjugated immunoliposomes for targeted combination chemotherapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3211. DOI: 10.3390/cancers12113211.
13. Wang F., Sun Y., Shi J. Programmed death-ligand 1 monoclonal antibody-linked immunoliposomes for synergistic efficacy of miR-130a and oxaliplatin in gastric cancers. *Nanomedicine (Lond)*. 2019;14(13):1729–1744. DOI: 10.2217/nnm-2019-0073.
14. Khayrani A. C., Mahmud H., Oo A. K. K., Zahra M. H., Oze M., Du J., Alam M. J., Afify S. M., Quora H. A. A., Shigehiro T., Calle A. S., Okada N., Seno A., Fujita K., Hamada H., Seno Y., Mandai T., Seno M. Targeting ovarian cancer cells overexpressing CD44 with immunoliposomes encapsulating glycosylated paclitaxel. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1042. DOI: 10.3390/ijms20051042.
15. Brown B. S., Patanam T., Mobli K., Celia C., Zage P. E., Bean A. J., Tasciotti E. Etoposide-loaded immunoliposomes as active targeting agents for GD2-positive malignancies. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(7):851–861. DOI: 10.4161/cbt.28875.
16. Mamot C., Drummond D. C., Noble C. O., Kallab V., Guo Z., Hong K., Kirpotin D. B., Park J. W. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer Res*. 2005;65(24):11631–11638. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1093.
17. Li X., Ren X., Liang J., Ma W., Wang Z., Yang Z. Delivery of sodium morrhuate to hemangioma endothelial cells using immunoliposomes conjugated with anti-VEGFR2/KDR antibody. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:6963–6972. DOI: 10.2147/IJN.S144056.
18. Zhang Y., Zhao Y., Dong D., Li X., Li Z., Li S., Wang J. Effects of isosorbide mononitrate loaded nanoparticles conjugated with anti-*Staphylococcus aureus* α-toxin on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Exp Ther Med*. 2020;19(2):1267–1274. DOI: 10.3892/etm.2019.8344.
19. Asmal M., Whitney J. B., Luedemann C., Carville A., Steen R., Letvin N. L., Geiben-Lynn R. In vivo anti-HIV activity of the heparin-activated serine protease inhibitor antithrombin III encapsulated in lymph-targeting immunoliposomes. *PLoS One*. 2012;7(11):e48234. DOI: 10.1371/journal.pone.0048234.
20. Kim H., Kee P. H., Rim Y., Moody M. R., Klegerman M. E., Vela D., Huang S. L., McPherson D. D., Laing S. T. Nitric oxide improves molecular imaging of inflammatory atheroma using targeted echogenic immunoliposomes. *Atherosclerosis.* 2013;231(2):252–260. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.026.
21. Biosca A., Dirscherl L., Moles E., Imperial S., Fernàndez-Busquets X. An immunoPEGliposome for targeted antimalarial combination therapy at the nanoscale. *Pharmaceutics*. 2019;11(7):341. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070341.
22. Khan A., Aljarbou A. N., Aldebasi Y. H., Allemailem K. S., Alsahli M. A., Khan S., Alruwetei A. M., Khan M. A. Fatty acid synthase (FASN) siRNA-encapsulated-Her-2 targeted Fab′-immunoliposomes for gene silencing in breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:5575–5589. DOI: 10.2147/IJN.S256022.
23. Zhuo H., Zheng B., Liu J., Huang Y., Wang H., Zheng D., Mao N., Meng J., Zhou S., Zhong L., Zhao Y. Efficient targeted tumor imaging and secreted endostatin gene delivery by anti-CD105 immunoliposomes. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):42. DOI: 10.1186/s13046-018-0712-8.
24. Sicard G., Paris C., Giacometti S., Rodallec A., Ciccolini J., Rocchi P., Fanciullino R. Enhanced antisense oligonucleotide delivery using cationic liposomes grafted with trastuzumab: a proof-of-concept study in prostate cancer. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1166. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121166.
25. Laing S. T., Kim H., Kopechek J. A., Parikh D., Huang S., Klegerman M. E., Holland C. K., McPherson D. D. Ultrasound-mediated delivery of echogenic immunoliposomes to porcine vascular smooth muscle cells in vivo. *J Liposome Res*. 2010;20(2):160–167. DOI: 10.3109/08982100903218918.
26. Burks S. R., Macedo L. F., Barth E. D., Tkaczuk K. H., Martin S. S., Rosen G. M., Halpern H. J., Brodie A. M., Kao J. P. Anti-HER2 immunoliposomes for selective delivery of electron paramagnetic resonance imaging probes to HER2-overexpressing breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(1):121–131. DOI: 10.1007/s10549-009-0715-4.
27. Li S., Goins B., Hrycushko B. A., Phillips W. T., Bao A. Feasibility of eradication of breast cancer cells remaining in postlumpectomy cavity and draining lymph nodes following intracavitary injection of radioactive immunoliposomes. *Mol Pharm*. 2012;9(9):2513–2522. DOI: 10.1021/mp300132f.
28. Kang Y. S., Jung H. J., Oh J. S., Song D. Y. Use of PEGylated immunoliposomes to deliver dopamine across the blood-brain barrier in a rat model of parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther.* 2016;22(10):817–823. DOI: 10.1111/cns.12580.
29. Agulla J., Brea D., Campos F., Sobrino T., Argibay B., Al-Soufi W., Blanco M., Castillo J., Ramos-Cabrer P. In vivo theranostics at the peri-infarct region in cerebral ischemia. *Theranostics*. 2013;4(1):90–105. DOI: 10.7150/thno.7088.

30. Wang Z., Li J., Xu X., Duan X., Cao G. Urea immunoliposome inhibits human vascular endothelial cell proliferation for hemangioma treatment. *World J Surg Oncol*. 2013;11:300. DOI: 10.1186/1477-7819-11-300.
31. Gagné J. F., Désormeaux A., Perron S., Tremblay M. J., Bergeron M. G. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1558(2):198–210. DOI: 10.1016/s0005-2736(01)00432-1.
32. Matsumura Y., Gotoh M., Muro K., Yamada Y., Shirao K., Shimada Y., Okuwa M., Matsumoto S., Miyata Y., Ohkura H., Chin K., Baba S., Yamao T., Kannami A., Takamatsu Y., Ito K., Takahashi K. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(3):517–525. DOI: 10.1093/annonc/mdh092.
33. Miller K., Cortes J., Hurvitz S. A., Krop I. E., Tripathy D., Verma S., Riahi K., Reynolds J. G., Wickham T. J., Molnar I., Yardley D. A. HERMIONE: a randomized Phase 2 trial of MM-302 plus trastuzumab versus chemotherapy of physician's choice plus trastuzumab in patients with previously treated, anthracycline-naïve, HER2-positive, locally advanced/metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. 2016;16:352. DOI: 10.1186/s12885-016-2385-z.
34. Mamot C., Ritschard R., Wicki A., Stehle G., Dieterle T., Bubendorf L., Hilker C., Deuster S., Herrmann R., Rochlitz C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. *Lancet Oncol*. 2012;13(12):1234–1241. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70476-X.
35. Damelin M., editor. Innovations for next-generation antibody-drug conjugates. Switzerland: Humana Press; 2018. 357 p. DOI: 10.1007/978-3-319-78154-9.
36. Ernstoff M. S., Ma W. W., Yung-Chin T. F., Munster P. N., Zhang T., Kamoun W., Pipas J. M., Chen S., Santillana S., Askoxylakis V. A phase 1 study evaluating the safety, pharmacology and preliminary activity of MM-310 in patients with solid tumors. *Journal of clinical oncology*. 2018;36(15):TPS2604–TPS2604.
37. Juszkiewicz K., Sikorski A. F., Czogalla A. Building blocks to design liposomal delivery systems. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9559. DOI: 10.3390/ijms21249559.
38. van Hoogevest P., Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2014;116(9):1088–1107. DOI: 10.1002/ejlt.201400219.
39. Yang F., Zheng Z., Zheng L., Qin J., Li H., Xue X., Gao J., Fang G. SATB1 siRNA-encapsulated immunoliposomes conjugated with CD44 antibodies target and eliminate gastric cancer-initiating cells. *Onco Targets Ther*. 2018;11:6811–6825. DOI: 10.2147/OTT.S182437.
40. Kim J. S., Kim M. W., Kang S. J., Jeong H. Y., Park S. I., Lee Y. K., Kim H. S., Kim K. S., Park Y. S. Tumor-specific delivery of therapeutic siRNAs by anti-EGFR immunonanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:4817–4830. DOI: 10.2147/IJN.S161932.
41. Khantasup K., Kopermsub P., Chaichoun K., Dharakul T. Targeted small interfering RNA-immunoliposomes as a promising therapeutic agent against highly pathogenic Avian Influenza A (H5N1) virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2816–2824. DOI: 10.1128/AAC.02768-13.
42. Ruwizhi N., Aderibigbe B. A. The efficacy of cholesterol-based carriers in drug delivery. *Molecules*. 2020;25(18):4330. DOI: 10.3390/molecules25184330.
43. Wong B. C., Zhang H., Qin L., Chen H., Fang C., Lu A., Yang Z. Carbonic anhydrase IX-directed immunoliposomes for targeted drug delivery to human lung cancer cells in vitro. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:993–1001. DOI: 10.2147/DDDT.S63235.
44. Zheng Z., Ji H., Zong W., Ran Q., Wang X., Yang X., Zhao Z., Yang C., Xiao Y. Construction and characterization of immunoliposomes targeting fibroblast growth factor receptor 3. *AMB Express*. 2019;9(1):150. DOI: 10.1186/s13568-019-0875-5.
45. Kheradmandi M., Ackers I., Burdick M. M., Malgor R., Farnoud A. M. Targeting dysfunctional vascular endothelial cells using immunoliposomes under flow conditions. *Cell Mol Bioeng*. 2020;13(3):189–199. DOI: 10.1007/s12195-020-00616-1.
46. Matusewicz L., Podkalicka J., Sikorski A. F. Immunoliposomes with simvastatin as a potential therapeutic in treatment of breast cancer cells overexpressing HER2-An in vitro study. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11):418. DOI: 10.3390/cancers10110418.
47. Kim H., Kee P. H., Rim Y., Moody M. R., Klegerman M. E., Vela D., Huang S. L., McPherson D. D., Laing S. T. Nitric oxide-enhanced molecular imaging of atheroma using vascular cellular adhesion molecule 1-targeted echogenic immunoliposomes. *Ultrasound Med Biol*. 2015;41(6):1701–1710. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.02.002.
48. Marqués-Gallego P., de Kroon A. I. Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. *Biomed Res Int*. 2014;2014:129458. DOI: 10.1155/2014/129458.
49. Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):431–444. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.026.
50. Loureiro J. A., Gomes B., Coelho M. A., do Carmo Pereira M., Rocha S. Immunoliposomes doubly targeted to transferrin receptor and to α-synuclein. *Future Sci OA*. 2015;1(4):FSO71. DOI: 10.4155/fso.15.71.
51. Merino M., Lozano T., Casares N., Lana H., Troconiz I. F., Ten Hagen T. L. M., Kochan G., Berraondo P., Zalba S., Garrido M. J. Dual activity of PD-L1 targeted Doxorubicin immunoliposomes promoted an enhanced efficacy of the antitumor immune response in melanoma murine model. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):102. DOI: 10.1186/s12951-021-00846-z.
52. Allen T. M., Brandeis E., Hansen C. B., Kao G. Y., Zalipsky S. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1237(2):99–108. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00085-h.
53. Cózar-Bernal M. J., García-Esteban E., Sánchez-Soto P. J., Rabasco A. M., González-Rodríguez M. L. Surface functionalizing of a lipid nanosystem to promote brain targeting: step-by-step design and physico-chemical characterization. *Pharm Dev Technol*. 2016;21(7):823–831. DOI: 10.3109/10837450.2015.1063651.
54. Koning G. A., Morselt H. W., Velinova M. J., Donga J., Gorter A., Allen T. M., Zalipsky S., Kamps J. A., Scherphof G. L. Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1420(1–2):153–167. DOI: 10.1016/s0005-2736(99)00091-7.
55. Xu L., Huang C. C., Huang W., Tang W. H., Rait A., Yin Y. Z., Cruz I., Xiang L. M., Pirollo K. F., Chang E. H. Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(5):337–346.
56. Kim H., Moody M. R., Laing S. T., Kee P. H., Huang S. L., Klegerman M. E., McPherson D. D. In vivo volumetric intravascular ultrasound visualization of early/inflammatory arterial atheroma using targeted echogenic immunoliposomes. *Invest Radiol*. 2010;45(10):685–691. DOI: 10.1097/RLI.0b013e3181ee5bdd.
57. Fleiner M., Benzinger P., Fichert T., Massing U. Studies on protein-liposome coupling using novel thiol-reactive coupling lipids: influence of spacer length and polarity. *Bioconjug Chem*. 2001;12(4):470–475. DOI: 10.1021/bc000101m.
58. Mercadal M., Carrion C., Domingo J. C., Petriz J., Garcia J., de Madariaga M. A. Preparation of immunoliposomes directed against CD34 antigen as target. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1371(1):17–23. DOI: 10.1016/s0005-2736(98)00021-2.
59. Gosk S., Moos T., Gottstein C., Bendas G. VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(4):854–863. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.12.021.
60. Bendas G., Krause A., Bakowsky U., Vogel J., Rothe U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *International journal of pharmaceutics*. 1999;181:79–93. DOI: 10.1016/s0378-5173(99)00002-2.
61. Liang B., Shahbaz M., Wang Y., Gao H., Fang R., Niu Z., Liu S., Wang B., Sun Q., Niu W., Liu E., Wang J., Niu J. Integrinβ6-targeted immunoliposomes mediate tumor-specific drug delivery and enhance therapeutic efficacy in colon carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1183–1195. DOI: 10.1158 / 1078-0432.CCR-14-1194.
62. Harding J. A., Engbers C. M., Newman M. S., Goldstein N. I., Zalipsky S. Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1327(2):181–192. DOI: 10.1016/s0005-2736(97)00056-4.

63. Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V. P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J Control Release*. 2012;160(2):264–273. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.12.002.
64. Kumar P., Huo P., Liu B. Formulation strategies for folate-targeted liposomes and their biomedical applications. *Pharmaceutics*. 2019;11(8):381. DOI: 10.3390/pharmaceutics11080381.
65. Viswanathan S., Rani C., Delerue-Matos C. Ultrasensitive detection of ovarian cancer marker using immunoliposomes and gold nanoelectrodes. *Anal Chim Acta*. 2012;726:79–84. DOI: 10.1016/j.aca.2012.03.025.
66. Scavo M. P., Cutrignelli A., Depalo N., Fanizza E., Laquintana V., Gasparini G., Giannelli G., Denora N. Effectiveness of a controlled 5-FU delivery based on FZD10 antibody-conjugated liposomes in colorectal cancer in vitro models. *Pharmaceutics.* 2020;12(7):650. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070650.
67. Benzinger P., Martiny-Baron G., Reusch P., Siemeister G., Kley J. T., Marmé D., Unger C., Massing U. Targeting of endothelial KDR receptors with 3G2 immunoliposomes in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1466(1–2):71–78. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00172-3.
68. Pan X., Wu G., Yang W., Barth R. F., Tjarks W., Lee R. J. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR. *Bioconjug Chem.* 2007;18(1):101–108. DOI: 10.1021/bc060174r.
69. Kley J., Fichert T., Massing U. Synthesis of novel thiol-reactive amphiphilic lipids based on cholesterol for protein-liposome coupling. *Monatshefte fuer Chemie*. 1998;129:319–327. https://doi.org/10.1007/PL00000090.
70. Asadpour O., Rahbarizadeh F. Phospholipase-Cγ1 signaling protein down-regulation by oligoclonal-VHHs based immuno-liposome: a potent metastasis deterrent in HER2 positive breast cancer cells. *Cell J*. 2020;22(1):30–39. DOI: 10.22074/cellj.2020.6704.
71. Shigehiro T., Kasai T., Murakami M., Sekhar S. C., Tominaga Y., Okada M., Kudoh T., Mizutani A., Murakami H., Salomon D. S., Mikuni K., Mandai T., Hamada H., Seno M. Efficient drug delivery of Paclitaxel glycoside: a novel solubility gradient encapsulation into liposomes coupled with immunoliposomes preparation. *PLoS One*. 2014;9(9):e107976. DOI: 10.1371/journal.pone.0107976.
72. Cortese K., Marconi S., Aiello C., Gagliani M. C., Pilato S., Zappacosta R., Fontana A., Castagnola P. Liposomes loaded with the proteasome inhibitor Z-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal are effective in inducing apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Membranes (Basel)*. 2020;10(5):91. DOI: 10.3390/membranes10050091.
73. Gholizadeh S., Dolman E. M., Wieriks R., Sparidans R. W., Hennink W. E., Kok R. J. Anti-GD2 immunoliposomes for targeted delivery of the survivin inhibitor sepantronium bromide (YM155) to neuroblastoma tumor cells. *Pharm Res*. 2018;35(4):85. DOI: 10.1007/s11095-018-2373-x.
74. Ueno S., Kim M. W., Lee G., Park Y. I., Niidome T., Lee R. Development of ErbB2-targeting liposomes for enhancing drug delivery to ErbB2-positive breast cancer. *Pharmaceutics.* 2020;12(6):585. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060585.
75. Iden D. L., Allen T. M. In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1513(2):207–216. DOI: 10.1016/s0005-2736(01)00357-1.
76. Eloy J. O., Petrilli R., Brueggemeier R. W., Marchetti J. M., Lee R. J. Rapamycin-loaded immunoliposomes functionalized with trastuzumab: a strategy to enhance cytotoxicity to HER2-positive breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(1):48–56.
77. Mercadal M., Domingo J. C., Petriz J., Garcia J., de Madariaga M. A. Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1509(1–2):299–310. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00305-9.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-113-120
УДК 615.45

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка диспергируемых в полости рта таблеток ибупрофена на основе полимер-лекарственного комплекса

В. Р. Тимергалиева, Р. Р. Хуснутдинов, Р. Р. Мусина, Е. С. Елизарова, Р. Р. Алсынбаев, Ш. Ф. Насибуллин, Р. И. Мустафин✉

Институт фармации, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

✉ **Контактное лицо:** Мустафин Руслан Ибрагимович. **E-mail:** rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: В. Р. Тимергалиева – https://orcid.org/0000-0002-3690-8905; Р. Р. Хуснутдинов – https://orcid.org/0000-0001-8347-4591; Р. Р. Мусина – https://orcid.org/0000-0003-2401-7440; Е. С. Елизарова – https://orcid.org/0000-0001-9264-9576; Р. Р. Алсынбаев – https://orcid.org/0000-0002-4755-6968; Ш. Ф. Насибуллин – https://orcid.org/0000-0002-7255-8041; Р. И. Мустафин – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Статья поступила: 11.05.2022 **Статья принята в печать:** 08.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Диспергируемые в ротовой полости системы доставки лекарств являются весьма перспективным направлением в разработке современных лекарственных форм (ЛФ). Они предназначены как для системного, так и для местного действия активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), входящих в их состав. АФИ из диспергируемых форм попадают непосредственно в системный кровоток, минуя «эффект первого прохождения через печень».

Цель. Разработка диспергируемых в ротовой полости таблеток на основе полимер-лекарственного комплекса (ПЛК) Eudragit® EPO/ибупрофена и оценка высвобождения АФИ из полученной системы.

Материалы и методы. Получены образцы ПЛК при различном соотношении Eudragit® EPO (EPO) и ибупрофена (ИБ), а также при разном порядке смешивания. Турбидиметрические исследования по поиску стехиометрии образующегося ПЛК EPO/ИБ проводили спектрофотометрически (Lambda 25, PerkinElmer, США) при длине волны 600 нм. Термический анализ проводился методом модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (мДСК) на приборе Discovery™ DSC (TA Instruments, США). Образцы, завальцованные в алюминиевые тигли Tzero (TA Instruments, США), сканировали в диапазоне температур от 0 до 250 °C при скорости 2 °C/мин. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific, США) с ATR насадкой, в диапазоне от 500 до 4000 $см^{-1}$. Сушка образцов комплексов и диспергируемых таблеток проводилась в лабораторной лиофильной сушилке FreeZone 1L (Labconco, США) в течение суток при температуре –49 °C и при давлении 0,350 мбар. Оценку высвобождения проводили на тестере растворения DT 828 (ERWEKA GmbH, Германия) в объеме 900 мл, при 37 ± 0,5 °C и скорости вращения лопастей 50 об/мин.

Результаты и обсуждение. Исследования по образованию полимер-лекарственных комплексов Eudragit® EPO/ибупрофен (EPO/ИБ) проводили при различном мольном соотношении. На образцах ПЛК и индивидуальных компонентов наблюдаются полосы, характерные как для EPO – при 2770 и 2820 $см^{-1}$, подтверждающие наличие неионизированных диметиламино-групп, так и при 1725 $см^{-1}$, соответствующую валентным колебаниям карбоксильных групп. Появление новой полосы при 1573 $см^{-1}$ подтверждает образование ионной связи между карбоксилатными группами ИБ и ионизированными диметиламино-группами EPO. мДСК-термограммы образцов характеризуются единственной температурой стеклования (T_c) при 27,3 ± 0,3 °C (для соотношения 1:2) и 44,9 ± 0,4 °C (для соотношения 1:1), что подтверждает образование полимер-лекарственных комплексов. Получены ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен в мольном соотношении 1:2 и 1:1 и диспергируемые в полости рта таблетки на их основе методом лиофилизации. Полученные системы характеризуются немедленным высвобождением ИБ с максимальными показателями при 30 мин – для состава 1:1 и 60 мин для состава 1:2.

Заключение. Полимер-лекарственный комплекс Eudragit® EPO/ибупрофен может быть использован для разработки диспергируемых в ротовой полости таблеток, обеспечивая немедленное высвобождение ИБ.

Ключевые слова: диспергируемые в полости рта таблетки, Eudragit® EPO, ибупрофен

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

Вклад авторов. Р. Р. Хуснутдинов, Р. Р. Мусина, Р. Р. Алсынбаев проводили синтез полимер-лекарственного комплекса, турбидиметрические исследования. Р. Р. Хуснутдинов проводил ИК-спектроскопию образцов. Ш. Ф. Насибуллин проводил мДСК-анализ образцов. Е. С. Елизарова получала образцы диспергируемых таблеток. Р. Р. Мусина, Р. Р. Алсынбаев, В. Р. Тимергалиева проводили оценку высвобождения. В. Р. Тимергалиева проводила написание и корректировку статьи. Р. И. Мустафин проводил концептуализацию и методологию исследования, а также корректировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все соавторы согласовывали итоговую версию статьи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 20-75-00051).

Для цитирования: Тимергалиева В. Р., Хуснутдинов Р. Р., Мусина Р. Р., Елизарова Е. С., Алсынбаев Р. Р., Насибуллин Ш. Ф., Мустафин Р. И. Разработка диспергируемых в полости рта таблеток ибупрофена на основе полимер-лекарственного комплекса. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):113–120. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-113-120

© Тимергалиева В. Р., Хуснутдинов Р. Р., Мусина Р. Р., Елизарова Е. С., Алсынбаев Р. Р., Насибуллин Ш. Ф., Мустафин Р. И., 2022
© Timergalieva V. R., Khusnutdinov R. R., Musina R. R., Elizarova E. S., Alsynbaev R. R., Nasibullin Sh. F., Moustafine R. I., 2022

Development of Orodispersible Ibuprofen Tablets Based on a Polymer-drug Complex

Venera R. Timergalieva, Ramil R. Khusnutdinov, Regina R. Musina, Elizaveta S. Elizarova, Radmir R. Alsynbaev, Shamil F. Nasibullin, Rouslan I. Moustafine✉

Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: Venera R. Timergalieva – https://orcid.org/0000-0002-3690-8905; Ramil R. Khusnutdinov – https://orcid.org/0000-0001-8347-4591; Regina R. Musina – https://orcid.org/0000-0003-2401-7440; Elizaveta S. Elizarova – https://orcid.org/0000-0001-9264-9576; Radmir R. Alsynbaev – https://orcid.org/0000-0002-4755-6968; Shamil F. Nasibullin – https://orcid.org/0000-0002-7255-8041; Rouslan I. Moustafine – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Received: 11.05.2022 **Revised:** 08.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Orodispersible dosage forms are a very promising direction in the development of dosage forms. Such dosage forms are designed for both systemic and local action of the active pharmaceutical ingredients that make up their composition. Active pharmaceutical ingredients from orodispersible forms enter directly into the systemic circulation, bypassing the "first pass effect".

Aim. Development of orodispersible tablets based on the Eudragit® EPO/ibuprofen polymer-drug complex and evaluation of ibuprofen release from the resulting system.

Materials and methods. Samples of the polymer-drug complex (PDC) were obtained with different ratios of EPO and ibuprofen, as well as with different mixing orders. Turbidimetric studies to find the stoichiometry of the resulting EPO/IB PLC were performed spectrophotometrically (Lambda 25, PerkinElmer, U.S.A.) at a wavelength of 600 nm. Thermal analysis was performed by modulation differential scanning calorimetry (mDSC) on a Discovery™ DSC instrument (TA Instruments, U.S.A.). Samples sealed in Tzero aluminum pans (TA Instruments, U.S.A.) were scanned in the temperature range from 0 to 250 °C at a speed of 2 °C/min. IR spectra were recorded on a Nicolet iS5 FT-IR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) with an ATR nozzle, in the range from 500 to 4000 cm^{-1}. Drying of samples of complexes and dispersible tablets was carried out in a FreeZone 1L laboratory freeze dryer (Labconco, U.S.A.) for a 24 hours at a temperature of –49 °C and at a pressure of 0.350 mbar. The drug release was evaluated on a dissolution tester DT 828 (ERWEKA GmbH, Germany) in a volume of 900 ml, at 37 ± 0.5 °C and a blade rotation speed of 50 rpm.

Results and discussion. Studies on the formation of PDC Eudragit® EPO/ibuprofen (EPO/IB) were carried out at various molar ratios. On samples of PDC and individual components, bands are observed that are characteristic both for EPO – at 2770 and 2820 cm^{-1}, confirming the presence of non-ionized dimethylamino groups, and at 1725 cm^{-1}, corresponding to the stretching vibrations of carboxyl groups. A new band is appeared at 1573 cm^{-1}, which confirm the formation of ionic bonds between carboxylate groups of IB and ionized dimethylamino groups of EPO. The mDSC thermograms of the samples are characterized by a single glass transition temperature (T_g) at 27,3 ± 0,3 °C (for molar ratio 1:2) and 44,9 ± 0,4 °C. (for molar ratio 1:1), which confirm the formation of polymer-drug complexes. Received PDC Eudragit® EPO/ibuprofen in a molar ratio of 1:2 and 1:1 and oral dispersible tablets based on them by lyophilization. The resulting systems are characterized by immediate release of IB with maximum rates at 30 min for a 1:1 composition and 60 min for a 1:2 composition.

Conclusion. Eudragit® EPO/ibuprofen polymer drug complex can be used to develop orodispersible tablets providing immediate release of IB.

Keywords: orodispersible tablets, Eudragit® EPO, ibuprofen

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. Ramil R. Khusnutdinov, Regina R. Musina and Radmir R. Alsynbaev were carried out the synthesis of a polymer-drug complex and turbidimetric studies. Ramil R. Khusnutdinov conducted FT-IR spectroscopy of samples. Shamil F. Nasibullin performed DSC analysis of samples. Elizaveta S. Elizarova received samples of orodispersible tablets. Regina R. Musina, Radmir R. Alsynbaev and Venera R. Timergalieva were carried out the drug release experiments evaluation. Venera R. Timergalieva wrote and corrected the article. Rouslan I. Moustafine was responsible for conceptualization and research methodology, as well as reviewed and corrected the article. The article was written with the participation of all co-authors. All co-authors agreed on the final version of the article.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project № 20-75-00051 (to V.R.T., R.R.K., E.S.E.).

For citation: Timergalieva V. R., Khusnutdinov R. R., Musina R. R., Elizarova E. S., Alsynbaev R. R., Nasibullin Sh. F., Moustafine R. I. Development of orodispersible ibuprofen tablets based on a polymer-drug complex. *Drug development & registration.* 2022;11(3):113–120. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-113-120

ВВЕДЕНИЕ

Диспергируемые в ротовой полости системы доставки лекарств являются весьма перспективным направлением в разработке современных лекарственных форм (ЛФ) [1–6]. Они предназначены как для системного, так и для местного действия активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), входящих в их состав [5, 7]. Согласно фармакопейным требованиям, диспергируемые в ротовой полости ЛФ, должны диспергироваться в течение трех минут [2]. Преимуществами данных ЛФ является удобство применения для пациентов с нарушениями функций глотания, дисфагией, а также в гериатрии и педиатрии [2–4, 8–9]. А также, по сравнению с пероральными формами, АФИ из диспергируемых форм попадают непо-

средственно в системный кровоток, минуя «эффект первого прохождения через печень», что достигается благодаря высокому кровоснабжению ротовой полости, а также мукоадгезивным свойствам компонентов, входящих в состав этих ЛФ, обеспечивающих удержание частиц на поверхности слизистой оболочки ротовой полости [7, 10–20].

Для разработки диспергируемых таблеток нами был выбран полимер-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO и ибупрофена. Eudragit® EPO – терполимер фармацевтического назначения, используемый в пероральных ЛФ с модифицированным высвобождением [21–23]. Ранее нашей научной группой были исследованы мукоадгезивные свойства Eudragit® EPO, а также поликомплексов, полученных с его участием, получены системы для трансбуккальной доставки метронидазола и метформина [10, 11].

Целью настоящей работы является разработка диспергируемых таблеток на основе полимер-лекарственного комплекса Eudragit® EPO/ибупрофена и оценка высвобождения АФИ из полученных систем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован Eudragit® EPO (EPO) – терполимер *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМА) с метилметакрилатом (ММА) и бутилметакрилатом (BuMA), (ПДМАЭМА-*co*-ММА-*co*-BuMA при молярном соотношении 2:1:1, ММ 150 кДа) в качестве катионного сополимера (Evonik Industries AG, Германия). Полимер использовали после сушки при 40 °С в вакуумном сушильном шкафу VD 23 (Binder, Германия) в течение 2 дней. В качестве аниона, а также АФИ использовали ибупрофен (Sigma-Aldrich, США). В качестве вспомогательных веществ, необходимых для формирования диспергируемых в ротовой полости таблеток, использовали мальтодекстрин (ДЭ 16,5–19,5) и Span® 80 (ТМ 80, 1000–2000 МПа) производства Merck (Sigma-Aldrich, США). Искусственную слюну готовили из следующих компонентов: хлорид кальция (х.ч.) 0,444 г, хлорид калия (х.ч.) 0,745 г, хлорид натрия (х.ч.) 0,4096 г, гидрокарбонат натрия (х.ч.) 0,168 г, калия дигидрофосфат (х.ч.) 0,9112 г (ООО НПФ «ТатХимПродукт», Россия), вода деионизированная до 1 л.

Получение образцов полимер-лекарственного комплекса EPO-ибупрофен. При приготовлении растворов полимера исходили из молекулярной массы его звена. Образцы ПЛК получали при различном мольном соотношении EPO и ИБ, а также при разном порядке смешивания их растворов. Для этого готовили водные растворы EPO в концентрациях от 0,002 до 0,05 М, предварительно растворяя навески полимера в кислой среде с добавлением 1 М раствора уксусной кислоты (pH = 2), и последующим доведением до pH взаимодействия равной 6,5 с помощью 1 М раствора NaOH. Раствор ИБ использовали в концентрации 0,005 М, предварительно растворяя АФИ в щелочной среде с добавлением 1 М раствора NaOH (pH = 9), и последующим доведением до pH взаимодействия равной 6,5 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты. Затем к образцам полимера приливали одинаковое количество раствора ибупрофена (прямой порядок смешивания). Образцы выдерживали в течение трех суток для полноты протекания реакции. Для получения ПЛК при обратном порядке смешивания были приготовлены водные растворы ИБ в концентрациях от 0,001 до 0,025 М, предварительно растворенные в щелочной среде с добавлением 1 М раствора NaOH (pH = 9), и последующим доведением до pH взаимодействия равной 6,5 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты. Раствор EPO в этом случае готовили в концентрации 0,005 М, предварительно растворяя навеску EPO в кислой среде с добавлением 1 М раствора уксусной кислоты (pH = 2), с последующим доведением до pH взаимодействия равной 6,5 с помощью 1 М раствора NaOH. Затем к растворам ИБ приливали одинаковое количество раствора EPO (обратный порядок смешивания). Образцы также выдерживали в течение трех суток. Оценку степени мутности смешиваемых растворов проводили турбидиметрически на УФ-ВИД-спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 600 нм.

Термический анализ проводился методом ДСК с моделируемой температурой (мДСК) на приборе Discovery™ DSC (TA Instruments, США). Образцы в количестве от 5 до 7 мг в герметично завальцованных с помощью специального пресса (TA Instruments, США), алюминиевых тиглях Tzero помещались в термоячейку прибора, предварительно откалиброванного с использованием эталонных стандартов (бензойная кислота, октадекан и металлический индий), и сканировались в диапазоне температур от 0 до 250 °С при скорости 2 °С/мин.

ИК-спектры ПЛК в сравнении с индивидуальными полимером (EPO) и АФИ (ИБ), а также их физической смесью в равном соотношении (1:1) регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet iS5 (Thermo Fisher Scientific, США) с насадкой НПВО (ATR) с использованием цинк-селенового кристалла в диапазоне от 500 до 4000 $см^{-1}$. Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах проводили в соответствии с литературными данными [24][1,2].

Синтез ПЛК в количествах, необходимых для дальнейших фармацевтических исследований, проводили смешивая растворы EPO и ИБ (с предварительным растворением и доведением до pH взаимодействия, как описано выше) в соотношениях EPO/ИБ (1:1) и 1:2 (по молям). Полученные осадки ПЛК отделяли от надосадочной жидкости, промывали троекратно водой очищенной и лиофильно высушивали (FreeZone 1L, Labconco, США) в течение суток при температуре –49 °С; основную сушку проводили при давлении 0,350 мбар.

[1] Spectrophotometry and light-scattering. Available at: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c851.html#usp29nf24s0_c851. Accessed: 03.06.2022.

[2] EVONIC. Available at: https://corporate.evonik.com/en. Accessed: 03.06.2022.

Для приготовления диспергируемых в полости рта таблеток, 100 мг, ПЛК диспергировали в 50%-м сиропе мальтодекстрина, добавляли спан-80 – 1,42 % от общей массы смеси. Затем смесь разливали в блистеры для таблеток, замораживали в лабораторной лиофильной сушилке FreeZone 1L (Labconco, США) в течение суток при температуре –49 °С; основную сушку также проводили при давлении 0,350 мбар. Выход процесса приготовления диспергируемых в полости рта таблеток составил 95 % (схема получения представлена на рисунке 1).

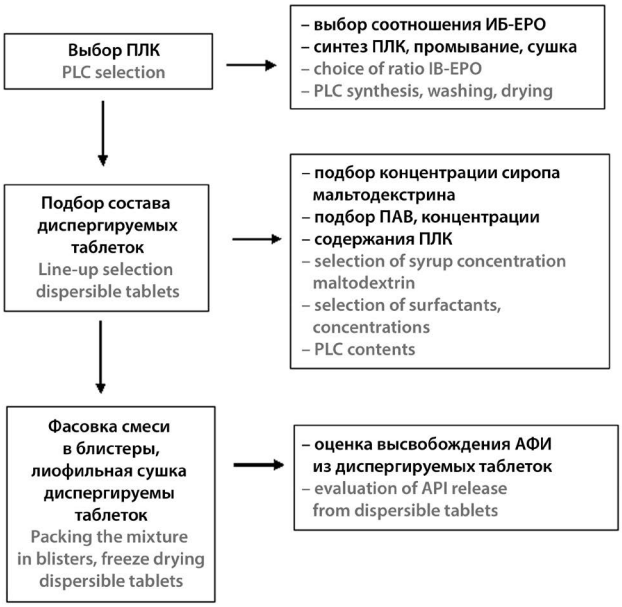


Рисунок 1. Схема получения диспергируемых в полости рта таблеток

Figure 1. Scheme of preparing orodispersible tablets

Оценку высвобождения проводили на тестере растворения DT 828 (ERWEKA GmbH, Германия) при 37 ± 0,5 °С и при скорости вращения лопастей 50 об/мин. В качестве среды растворения использовали искусственную слюну объемом 900 мл. Диспергируемые в полости рта таблетки помещали на дно стакана, накрывая их перфорированным диском по фармакопейному методу растворения USP 5 «лопатка над диском» – узкоспециализированный метод, позволяющий проводить оценку высвобождения из трансдермальных и сублингвальных ЛФ[1]. Каждые 30 мин производили отбор среды в объеме 5 мл для анализа с восполнением соответствующего объема чистой средой. Испытание на высвобождение проводили в течение 5 часов. Количество высвобожденного ИБ определяли УФ-спектрофотометрически (Lambda 25, PerkinElmer, США) при длине волны 221 нм.

[1] Методы оценки высвобождения по фармакопее США (USP dissolution testers). Доступно по: https://www.usp.org/chemical-medicines/dissolution. Ссылка активна на 03.06.2022.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Eudragit® EPO является терполимером фармацевтического назначения, используемым для получения, в основном, пероральных ЛФ с модифицированным высвобождением [21–23]. Благодаря наличию положительно заряженных диметиламино-групп в структуре EPO становится очевидным его взаимодействие с отрицательно заряженными карбоксильными группами ибупрофена (рисунок 2). Поэтому для оценки возможного взаимодействия компонентов были получены ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен (EPO/ИБ) при различных мольных соотношениях. Результаты турбидиметрического исследования надосадочных жидкостей представлены на рисунке 3.

Исходя из полученных результатов можно отметить, что при прямом порядке смешивания увеличение доли ИБ в системе приводит к возрастанию мутности надосадочной жидкости [в составах Z (EPO/ИБ) от 0,2 до 1] (рисунки 3–5). При обратном порядке смешивания образование осадка ПЛК наблюдается в образцах составов Z (EPO/ИБ) от 0,3 до 2. Для дальнейших исследований нами были выбраны два состава ПЛК EPO/ИБ: при эквимольном соотношении компонентов (1:1) и с двухкратным мольным избытком ибупрофена (1:2).

ИК-спектры образцов ПЛК в эквимольном соотношении, EPO, ибупрофена и их физической смеси (ФС) в таком же соотношении представлены на рисунке 6. Стоит отметить, что ИК-спектры ФС и ИБ являются, по сути, их суперпозицией, что доказывает отсутствие химической связи между полимером и АФИ при механическом смешении субстанций. На образцах же ПЛК (1:1) в сравнении с индивидуальными компонентами появляются полосы, характерные как для EPO – при 2770 и 2820 $см^{-1}$, подтверждающие наличие диметиламино-групп, так и при 1725 $см^{-1}$, соответствующую валентным колебаниям карбоксильных групп, а также 1573 $см^{-1}$, подтверждающая образование ионной связи между карбоксилатными группами ИБ и ионизированными диметиламино-группами EPO [24].

Для подтверждения образования полимер-лекарственного комплекса был также проведен мДСК-анализ. Исходя из полученных результатов образцы характеризуются единственной температурой стеклования, что подтверждает образование их как нового химически индивидуального соединения. Для образца EPO/ИБ (в соотношении 1:2) T_c составила 27,3 ± 0,3 °С (рисунок 7), а в случае с EPO/ИБ (в соотношении 1:1) температура стеклования составила 44,9 ± 0,4 °С.

Для получения ЛФ предварительно был получен ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен в мольных соотношениях 1:2 и 1:1. Диспергируемые в полости рта таблетки, полученные после сублимационной сушки, представляли собой твердые ровные таблетки, которые легко извлекались из блистера.

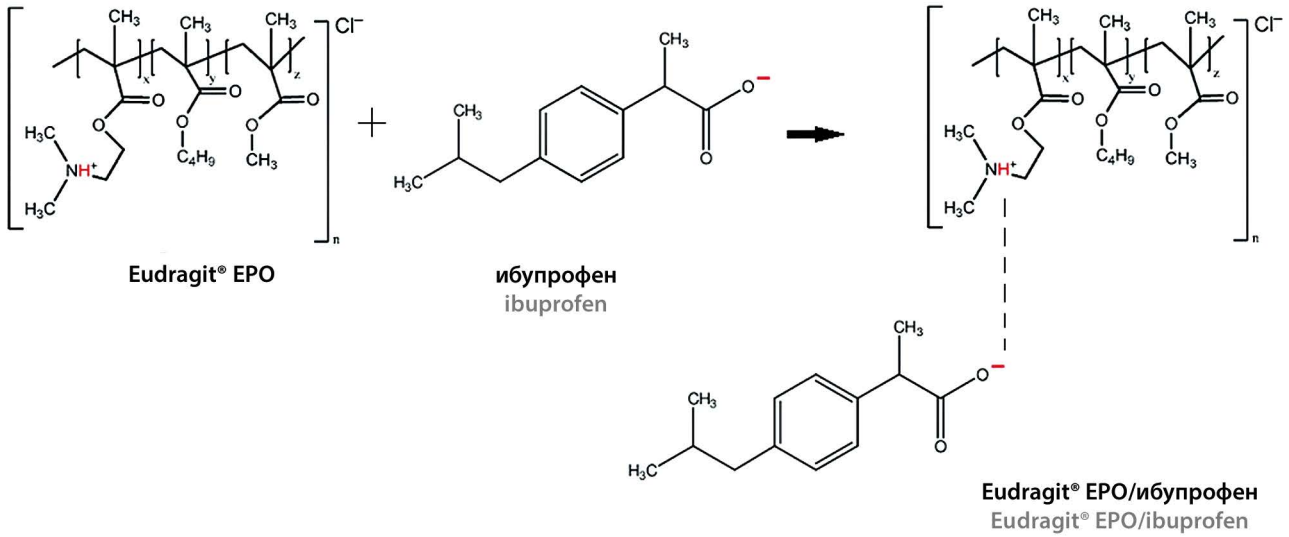


Рисунок 2. **Схема взаимодействия структурного мономерного фрагмента Eudragit® EPO и ибупрофена**

Figure 2. **Scheme of the interaction of the structural monomeric fragment of Eudragit® EPO and ibuprofen**

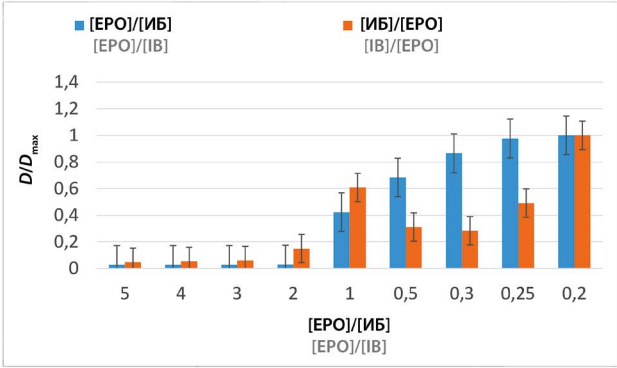


Рисунок 3. **Зависимость относительной оптической плотности (*D*) системы Eudragit® EPO/ибупрофен от состава полимер-лекарственного комплекса (*Z* = [EPO]/[ИБ]) при прямом (голубой цвет) и обратном (оранжевый цвет) порядке смешивания растворов при pH = 6,5; D_{max} – максимальное значение оптической плотности в системе**

Figure 3. **Dependence of the relative optical density (*D*) of the Eudragit® EPO/ibuprofen system on the composition of the polymer-drug complex (*Z* = [EPO]/[IB]) with the forward (blue color) and reverse (orange color) order of mixing solutions at pH = 6.5; D_{max} – the maximum value of the optical density in the system**

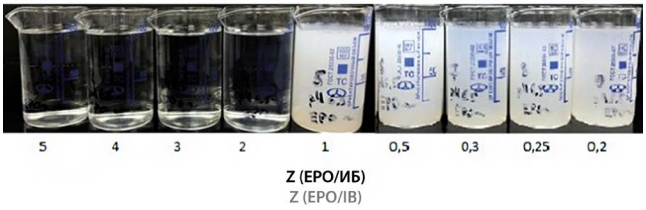


Рисунок 4. **Фото растворов образцов ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен, полученных при прямом порядке смешивания (pH = 6,5)**

Figure 4. **Photo of PDC solutions of the samples of Eudragit® EPO/ibuprofen in the direct order of mixing (pH = 6.5)**

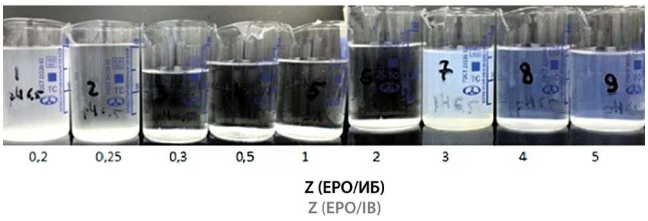


Рисунок 5. **Фото образцов ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен при обратном порядке смешивания растворов (pH = 6,5)**

Figure 5. **Photo of PDC samples of Eudragit® EPO/ibuprofen in the reverse order of mixing solutions (pH = 6.5)**

Оценка высвобождения проводилась в среде искусственной слюны в связи с тем, что полученные таблетки предназначены для диспергирования в полости рта, с последующим немедленным высвобождением АФИ. Особенность исследования заключалась в модифицировании метода растворения USP 2 – «лопастная мешалка» путем помещения таблетки под перфорированный диск, предназначенный для анализа фармакопейным методом растворения USP 5 – «лопатка над диском», с целью наибольшей имитации процесса высвобождением через слизистую ротовой полости (щеки).

Результаты высвобождения ибупрофена из диспергируемых в ротовой полости таблеток приведены на рисунке 8. Стоит отметить, что образцы, содержащие эквимольный состав ПЛК ЕРО/ИБ, показывают максимальные показатели высвобождения через 30 мин, затем к 60 мин уровень высвобождаемого АФИ снижается до 50 % и сохраняется на этом уровне в течение последующих 4 часов эксперимента. В случае образца ЕРО/ИБ 1:2 максимум высвобождения достигается через 60 мин, однако уровень высвобождаемого АФИ значительно ниже, чем при эквимольном составе. Возможно, что в случае экви-

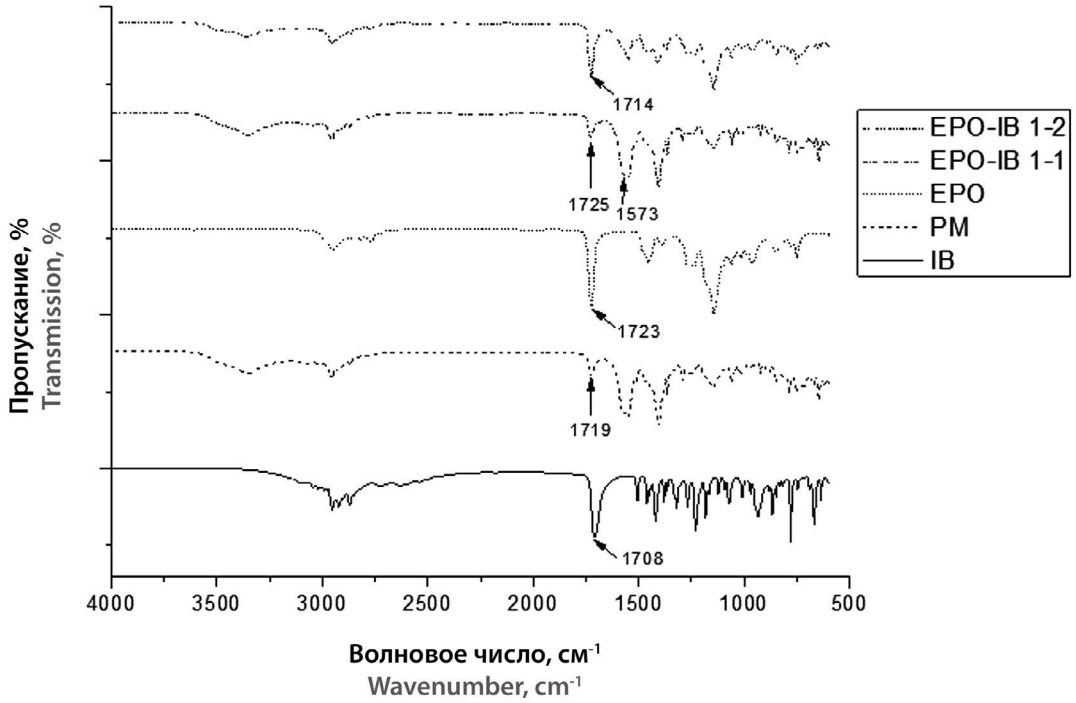


Рисунок 6. **ИК-спектры образцов ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен (IB-EPO 1-2; 1-1), Eudragit® EPO (EPO), физической смеси Eudragit® EPO и ибупрофена (PM), ибупрофена (IB) (по оси ординат – пропускание, %; по оси абсцисс – волновое число, $см^{-1}$)**

Figure 6. **FTIR spectra of Eudragit® EPO/ibuprofen (IB-EPO 1-2; 1-1) PDC samples, Eudragit® EPO (EPO), physical mixture of Eudragit® EPO and ibuprofen (PM), ibuprofen (IB) (along the ordinate axis – transmission, %; along the abscissa axis – wavenumber, cm^{-1})**

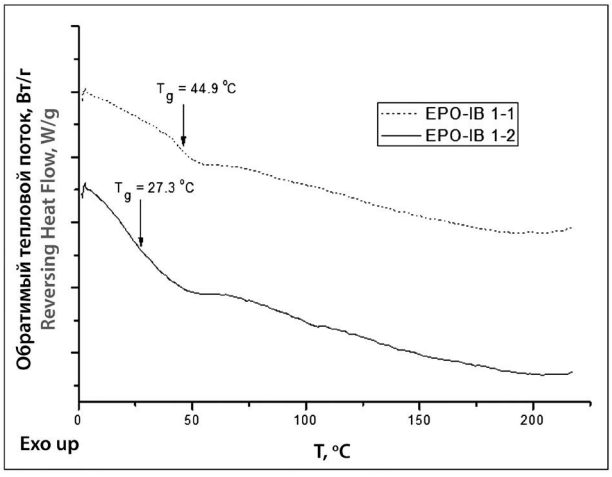


Рисунок 7. **ДСК-термограммы образцов ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен в мольных соотношениях 1:2 и 1:1 (по оси ординат – обратимый тепловой поток, Вт/г; по оси абсцисс – температура, °C)**

Figure 7. **DSC-MT thermograms of Eudragit® EPO/ibuprofen PDC samples in molar ratios of 1:2 and 1:1 (ordinate – reversing heat flow, W/g; abscissa – temperature, °C)**

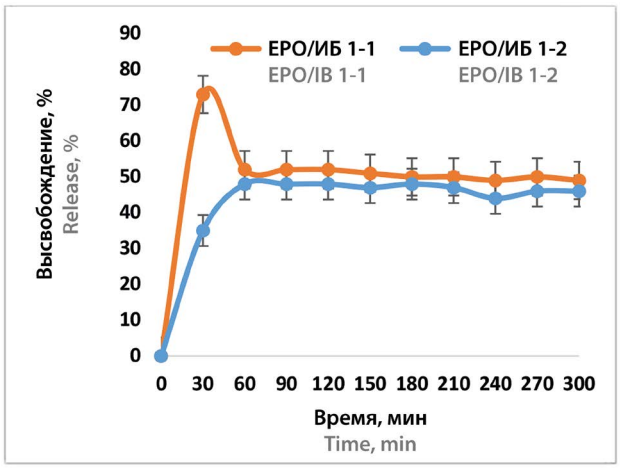


Рисунок 8. **Профили высвобождения ибупрофена из таблеток, полученных на основе ПЛК Eudragit® EPO/ибупрофен при соотношении компонентов 1:1 и 1:2**

Figure 8. **Ibuprofen release profiles from tablets based on Eudragit® EPO/ibuprofen PDC at a ratio of components 1:1 and 1:2**

мольного состава таблетки легче диспергируются и, соответственно, быстрее высвобождают ИБ. Фото образцов таблеток в процессе высвобождения приведены на рисунке 9, на основе которых можно проследить изменение внешнего вида матриц от этапа смачивания ее до образования диспергированных частиц, завершающиеся к 3–5 минутам, с последующим высвобождением АФИ из таблеток.

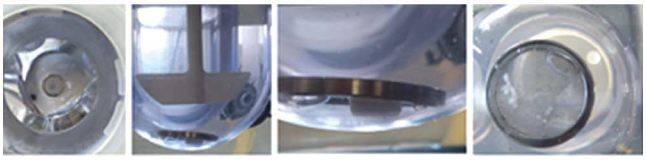


Рисунок 9. Изменение внешнего вида диспергируемых таблеток в процессе высвобождения АФИ

Figure 9. Changes of external appearance of orodispersible tablets during API release

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на структурных особенностях полимера фармацевтического назначения Eudragit® EPO, применяемого для получения лекарственных форм с модифицированным высвобождением, нами были получены полимер-лекарственные комплексы его с ибупрофеном. Использование такой конструкции в качестве трансмукозальной системы доставки является весьма перспективным направлением при разработке диспергируемых в полости рта таблеток. В связи с этим в работе были получены полимер-лекарственные комплексы Eudragit® EPO/ибупрофен (EPO/ИБ) при различных мольных соотношениях и, в зависимости от порядка смешивания их растворов, осуществлялся подбор оптимального состава. В результате проведенных исследований выбор пал на два состава: с эквимольным соотношением компонентов (1:1) и с двухкратным избытком ибупрофена (1:2). В соответствии с ИК-спектроскопическим и термическим анализом было выявлено, что полученные системы полимер-лекарственных комплексов представляют собой индивидуальные химические соединения, имеющие характеристические полосы поглощения для Eudragit® EPO и ибупрофена. Наличие новой характеристической полосы при 1573 $см^{-1}$ и единственной температуры стеклования у полученных образцов EPO/ИБ подтверждает образование полимер-лекарственного комплекса. На их основе были получены диспергируемые в полости рта таблетки и проведена оценка высвобождения ибупрофена из них по методу USP 5. Для полученных таблеток характерно немедленное высвобождение АФИ с максимальным высвобождением (порядка 75–80 % ИБ), которое наблюдается к 30 мин для состава 1:1. В случае состава 1:2 максимальное высвобождение (на уровне 40–50 %) достигается лишь к 60 мин, с последующим равномерным высвобождением в течение 4 часов для обеих сравниваемых систем. Таким образом, полученный полимер-лекарственный комплекс Eudragit® EPO/ибупрофен эквимольного состава может быть рекомендован для дальнейших исследований с целью разработки диспергируемых в ротовой полости таблеток, так как он обеспечивает немедленное высвобождение, включенного в полимер-лекарственный комплекс АФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Comoglu T., Inal O., Yaacoub H. B. Formulation and in vitro evaluation of ketoprofen fast-dissolving tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2015;21(8):1–8. DOI: 10.3109/10837450.2015.1022792.
2. Cilurzo F., Cupone I. E., Minghetti P., Selmin F., Montanari L. Fast dissolving films made of maltodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(3):895–900. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.06.032.
3. Cilurzo F., Cupone I. E., Minghetti P., Buratti S., Selmin F., Gennari C. G. M., Montanari L. Nicotine fast dissolving films made of maltodextrins: A feasibility study. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(4):1511–1517. DOI: 10.1208/s12249-010-9525-6.
4. Slavkova M., Breitkreutz J. Orodispersible drug formulations for children and elderly. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;75:2–9. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.02.015.
5. Comoglu T., Unal B. Preparation and evaluation an orally disintegrating tablet formulation containing a hydrophobic drug. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2015;20(1):60–64. DOI: 10.3109/10837450.2013.862636.
6. Borges A. F., Silva C., Coelho J. F. J., Simões S. Oral films: Current status and future perspective: II – Intellectual property, technologies and market needs. *Journal of Controlled Release*. 2015;206:108–121. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.012.
7. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive interpolyelectrolyte complexes for the buccal delivery of clobetasol. *Polymers*. 2018;10(2):85. DOI: 10.3390/polym10010085.
8. Wiedey R., Kokott M., Breitkreutz J. Orodispersible Tablets for pediatric drug delivery: current challenges and recent advances. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021;18(12):1873–1890. DOI: 10.1080/17425247.2021.2011856.
9. Musazzi U. M., Khalid G. M., Selmin F., Minghetti P., Cilurzo F. Trends in the production methods of orodispersible films. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;118963. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118963.
10. Викторова А. С., Елизарова Е. С., Романова Р. С., Тимергалиева В. Р., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Интерполимерные комплексы на основе Carbopol® и поли(2-этил-2-оксазолина) как носители для трансбуккальной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):48–55. DOI:10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55.
11. Мустафин Р. И., Будников В. В., Абдуллина С. Г., Насибуллин Ш. Ф., Салеев Р. А. Поликомплексный носитель для трансбуккальной мукоадгезивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):83–90. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-83-90.
12. Khutoryanskiy V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011;11:748–764. DOI: 10.1002/mabi.201000388.
13. Morales J. O., McConville J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;77:187–199. DOI: 10.1155/2018/2403802.
14. Kianfar F., Ayensu I., Boateng J. S. Development and physico-mechanical characterization of carrageenan and poloxamer-based lyophilized matrix as a potential buccal drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40:361–369. DOI: 10.3109/03639045.2012.762655 25.
15. Çelik B. Resperidone mucoadhesive buccal tablets: formulation design, optimization and evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11:3355–3365. DOI: 10.2147/DDDT.S150774.
16. Esim O., Savaser A., Ozkan C. K., Bayrak Z., Tas C., Ozkan Y. Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26:53–63. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.10.013.
17. Cilurzo F., Cupone I. E., Minghetti P., Buratti S., Gennari C. G. M., Montanari L. Diclofenac fast dissolving film: suppression of bitterness by a taste sensing system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2011;37(3):252–259. DOI: 10.3109/03639045.2010.505928.

18. Borges A. F., Silva C., Coelho J. F. J., Simões S. Oral films: Current status and future perspective: I – Galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*. 2015;206:1–19. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.006.
19. Khalid G. M., Selmin F., Musazzi U. M., Gennari C. G. M., Minghetti P., Cilurzo F. Trends in the characterization methods of orodispersible films. *Current Drug Delivery*. 2021;18(7):935–946. DOI: 10.2174/1567201818999201210212557.
20. Киржанова Е. А., Хуторянский В. В., Балабушевич Н. Г., Харенко А. В., Демина Н. Б. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2014;3:61–82.
21. Гордеева Д. С., Ситенкова (Буховец) А. В., Мустафин Р. И. Интерполиэлектролитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):72–76. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
22. Мустафин Р. И., Буховец А. В., Протасова А. А., Шайхрамова Р. Н., Ситенков А. Ю., Семина И. И. Сравнительное исследование поликомплексных систем для гастроретентивной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;1(10):48–51.
23. Guhmann M., Preis M., Gerber F., Pöllinger N., Breitkreutz J., Weitschies W. Design, development and in-vitro evaluation of diclofenac taste-masked orodispersible tablet formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(4):540–551. DOI: 10.3109/03639045.2014.884122.
24. Мустафин Р. И., Кабанова Т. В. Изучение диффузионно-транспортных свойств поликомплексных матричных систем образованных эудрагитами Е100 и L100. *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(2):34–38.

REFERENCES

1. Comoglu T., Inal O., Yaacoub H. B. Formulation and in vitro evaluation of ketoprofen fast-dissolving tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2015;21(8):1–8. DOI: 10.3109/10837450.2015.1022792.
2. Cilurzo F., Cupone I. E., Minghetti P., Selmin F., Montanari L. Fast dissolving films made of maltodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(3):895–900. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.06.032.
3. Cilurzo F., Cupone I. E., Minghetti P., Buratti S., Selmin F., Gennari C. G. M., Montanari L. Nicotine fast dissolving films made of maltodextrins: A feasibility study. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(4):1511–1517. DOI: 10.1208/s12249-010-9525-6.
4. Slavkova M., Breitkreutz J. Orodispersible drug formulations for children and elderly. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;75:2–9. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.02.015.
5. Comoglu T., Unal B. Preparation and evaluation an orally disintegrating tablet formulation containing a hydrophobic drug. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2015;20(1):60–64. DOI: 10.3109/10837450.2013.862636.
6. Borges A. F., Silva C., Coelho J. F. J., Simões S. Oral films: Current status and future perspective: II – Intellectual property, technologies and market needs. *Journal of Controlled Release*. 2015;206:108–121. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.012.
7. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive interpolyelectrolyte complexes for the buccal delivery of clobetasol. *Polymers*. 2018;10(2):85. DOI: 10.3390/polym10010085.
8. Wiedey R., Kokott M., Breitkreutz J. Orodispersible Tablets for pediatric drug delivery: current challenges and recent advances. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021;18(12):1873–1890. DOI: 10.1080/17425247.2021.2011856.
9. Musazzi U. M., Khalid G. M., Selmin F., Minghetti P., Cilurzo F. Trends in the production methods of orodispersible films. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019;118963. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118963.
10. Viktorova A. S., Elizarova E. S., Romanova R. S., Timergalieva V. R., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer complexes based on Carbopol® and poly(2-ethyl-2-oxazoline) as carriers for buccal delivery of metformin. *Drug development & registration*. 2021;10(1):48–55. (In Russ.) DOI:10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55.
11. Moustafine R. I., Budnikov V. V., Abdullina S. G., Nasibullin S. F., Saleev R. A. Polycomplex Carrier for Buccal Mucoadhesion Delivery of Metronidazole. *Drug development & registration*. 2020;9(2):83–90. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-83-90.
12. Khutoryanskiy V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011;11:748–764. DOI: 10.1002/mabi.201000388.
13. Morales J. O., McConville J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;77:187–199. DOI: 10.1155/2018/2403802.
14. Kianfar F., Ayensu I., Boateng J. S. Development and physico-mechanical characterization of carrageenan and poloxamer-based lyophilized matrix as a potential buccal drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40:361–369. DOI: 10.3109/03639045.2012.762655 25.
15. Çelik B. Resperidone mucoadhesive buccal tablets: formulation design, optimization and evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11:3355–3365. DOI: 10.2147/DDDT.S150774.
16. Esim O., Savaser A., Ozkan C. K., Bayrak Z., Tas C., Ozkan Y. Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2018;26:53–63. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.10.013.
17. Cilurzo F., Cupone I. E., Minghetti P., Buratti S., Gennari C. G. M., Montanari L. Diclofenac fast dissolving film: suppression of bitterness by a taste sensing system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2011;37(3):252–259. DOI: 10.3109/03639045.2010.505928.
18. Borges A. F., Silva C., Coelho J. F. J., Simões S. Oral films: Current status and future perspective: I – Galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*. 2015;206:1–19. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.03.006.
19. Khalid G. M., Selmin F., Musazzi U. M., Gennari C. G. M., Minghetti P., Cilurzo F. Trends in the characterization methods of orodispersible films. *Current Drug Delivery*. 2021;18(7):935–946. DOI: 10.2174/1567201818999201210212557.
20. Kirzhanova E. A., Khutoryanskiy V. V., Balabushevich N. G., Kharenko A. V., Demina N. B. Methods for analysis of mucoadhesion: from basic research to practical applications in dosage forms development. *Drug development & registration.* 2014;3(8):66–80. (In Russ.)
21. Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. Interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® copolymers as carriers for bioadhesive gastroretentive metronidazole delivery system. *Drug development & registration*. 2020;9(2):72–76. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
22. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Protasova A. A., Shaykhramova R. N., Sitenkov A. Y., Semina I. I. Comparative investigation of polycomplex systems for gastroretentive metformin delivery. *Drug development & registration*. 2015;1(10):48–51. (In Russ.)
23. Guhmann M., Preis M., Gerber F., Pöllinger N., Breitkreutz J., Weitschies W. Design, development and in-vitro evaluation of diclofenac taste-masked orodispersible tablet formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(4):540–551. DOI: 10.3109/03639045.2014.884122.
24. Mustafin R. I., Kabanova T. V. Diffusion transport properties of polymeric complex matrix systems based on Eudragit E100 and Eudragit L100 copolymers. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2005;39(2):89–93. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11094-005-0090-3.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129
УДК 615.014.2

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях

У. В. Ногаева, А. А. Наумова, А. Г. Новиньков, Е. В. Флисюк, М. А. Буракова, А. Н. Шиков, О. Н. Абросимова✉

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14А

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

ORCID: У. В. Ногаева – https://orcid.org/0000-0002-8214-7553; А. А. Наумова – https://orcid.org/0000-0002-0494-0740;
А. Г. Новиньков – https://orcid.org/0000-0001-5704-4344; Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; М. А. Буракова – https://orcid.org/0000-0002-3880-0359;
А. Н. Шиков – https://orcid.org/0000-0003-4351-0695; О. Н. Абросимова – https://orcid.org/0000-0002-0274-0139.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 10.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Изучение реологических свойств (динамическая и пластическая вязкость, предел текучести, степень и наличие тиксотропного эффекта, характер типа течения) занимает особое место при разработке мягких лекарственных форм, так как они активно влияют на стабильность лекарственного препарата в процессе хранения, на его технологические и потребительские характеристики.

Цель. Изучение основных реологических параметров разрабатываемых гелей и кремов на различных основах-носителях.

Материалы и методы. Для наработки экспериментальных образцов использовали мелоксикам, альгинат натрия, твин-80, пропиленгликоль, кремофор, глицерин, эфирное масло лимона и апельсина, карбопол 980, полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400), калины обыкновенной кора, ромашки аптечной цветки, хлоргексидина биглюконата 20 %, ментол, сорбит, масло кукурузное, моноглицериды дистиллированные (МГД), спирт цетиловый, кокосовое масло, салициловая кислота, воск эмульсионный, препарат ОС-20, триэтаноламин (ТЭА), эуксил РЕ 9010. В лабораторных условиях были наработаны 3 образца мягких лекарственных форм массой по 100,0. Изучение реологических характеристик исследуемых образцов проводили через 24 часа после их приготовления методом вискозиметрии на вискозиметре Anton Paar DV-2P (Anton Paar GmbH, Австрия), шпиндель L4. Исследования структурно-механических свойств образцов проводили на приборе, сконструированным в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете под руководством профессора, доктора фармацевтических наук В. А. Вайнштейна.

Результаты и обсуждение. При исследовании реологических свойств образцов было установлено, что наибольшей механической устойчивостью обладает образец № 1 (гель на основе альгината) и образец № 3 (крем). Наличие восходящих и нисходящих кривых петли гистерезиса указывает на то, что исследуемые образцы обладают тиксотропными свойствами. У образцов № 1 и 2 восходящая и нисходящая кривые течения накладываются друг на друга. Это явление характерно для всех гелей и является их особенностью. Релаксация структуры упруго-пластичного материала после деформации, вызванной введением тестера, происходит по логарифмическому закону. В состоянии покоя до введения штока тестера в материал структура не нарушена и масса образцов имеет максимальную густоту, то есть статическую вязкость. При введении штока тестера в массе происходит пластическая деформация, принудительное течение – напряжение в момент введения штока тестера отражает предел текучести. Далее при погруженном штоке тестера происходит тиксотропное восстановление разрушенных структурных связей. Такая закономерность в динамике сопротивления структуры наблюдается для структурированных (неньютоновских) жидкостей.

Заключение. Исследованы реологические свойства трех экспериментальных образцов, изготовленных на разных основах-носителях. Показана необходимость проведения реологических исследований на стадии разработки лекарственных средств с целью прогнозирования и гарантирования качества потребительских характеристик мягких лекарственных форм.

Ключевые слова: ротационный вискозиметр, структурно-механические свойства, тиксотропия, вязкость, реологические свойства

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

Вклад авторов. М. А. Буракова, Е. В. Флисюк, А. Н. Шиков, О. Н. Абросимова осуществили постановку задачи, обсудили результаты и написали текст статьи. У. В. Ногаева, А. А. Наумова, А. Г. Новиньков выполнили эксперимент, обработку полученных данных, обсудили результаты.

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., Наумова А. А., Новиньков А. Г., Флисюк Е. В., Буракова М. А., Шиков А. Н., Абросимова О. Н. Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):121–129. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129

Comparative Study of Rheological Properties of Gels and Creams on Different Carrier Bases

Uljana V. Nogaeva, Alyona A. Naumova, Alexander G. Novinkov, Elena V. Flisyuk, Marina A. Burakova, Alexander N. Shikov, Olesya N. Abrosimova✉

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

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

© Ногаева У. В., Наумова А. А., Новиньков А. Г., Флисюк Е. В., Буракова М. А., Шиков А. Н., Абросимова О. Н., 2022
© Nogaeva U. V., Naumova A. A., Novinkov A. G., Flisyuk E. V., Burakova M. A., Shikov A. N., Abrosimova O. N., 2022

ORCID: Uljana V. Nogaeva – https://orcid.org/0000-0002-8214-7553; Alyona A. Naumova – https://orcid.org/0000-0002-0494-0740; Alexander G. Novinkov – https://orcid.org/0000-0001-5704-4344; Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; Marina A. Burakova – https://orcid.org/0000-0002-3880-0359; Alexander N. Shikov – https://orcid.org/0000-0003-4351-0695; Olesya N. Abrosimova – https://orcid.org/0000-0002-0274-0139.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 10.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The study of rheological properties (dynamic and plastic viscosity, yield strength, the degree and presence of a thixotropic effect, the nature of the type of flow) are important for the development of soft dosage forms. These properties affect the stability of the dosage form during storage, its technological and consumer characteristics .

Aim. Study of the main rheological parameters of the developed gels and creams on various carrier bases.

Materials and methods. Meloxicam as active ingredient and excipients: sodium alginate, twin-80, propylene glycol, cremophor, glycerin, essential oils of lemon and orange, carbopol 980, polyethylene glycol-400 (PEG-400), viburnum bark, chamomile flowers, chlorhexidine bigluconate 20 %, menthol, sorbitol, corn oil, distilled monoglycerides (MHD), cetyl alcohol, coconut oil, salicylic acid, emulsion wax, preparation OS-20, triethanolamine (TEA), and euxil PE 9010 were used for the preparation of ex[eroimental samples. Three laboratory samples of soft formulations with the mass of 100 g each were prepared. The rheological properties of the samples were tested 24 hours after their preparation using Anton Paar DV-2P viscometer (Anton Paar GmbH, Austria), spindle L4. The structural and mechanical properties of the samples were tested using a device designed at the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University under thesupervision of Professor, Doctor of Pharmaceutical Sciences V. A. Vainshtein.

Results and discussion. The greatest mechanical stability was observed for the sample No. 1 (gel based on alginate) and sample No. 3 (cream). The ascending and descending hysteresis loop curves indicates that the test samples have thixotropic properties. Samples No. 1 and 2 have upward and downward flow curves superimposed on each other.This phenomenon is typical for all gels and is their feature. The relaxation of the structure of an elastic-plastic material after the deformation caused by the introduction of a tester stock occurs according to the logarithmic law. At rest, when the tester stockis not introduced into the material, the structure of tested samples is intact and samples has a maximum density (static viscosity). The introduction of the tester stock into the sample results in plastic deformation and forced flow. The tension at the moment of tester stock introduction reflects the yield strength.Further, with the immersed tester devoce, a thixotropic recovery of the destroyed structural bonds occurs. Such a pattern in the dynamics of structure resistance is observed for structured (non-Newtonian) liquids.

Conclusion. The rheological properties of three experimental soft formulations made on different carrier bases were investigated. The importance of rheological studies in the drug development of high e quality soft formulations was shown.

Keywords: rotational viscometer, structural-mechanical properties, thixotropy, viscosity, rheological properties

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. Marina A. Burakova, Elena V. Flisyuk, Olesya N. Abrosimova carried out the formulation of the problem, discussion of results and writing the text of the article. Uljana V. Nogaeva, Alyona A. Naumova, Alexander G. Novinkov performed the experiment, processing the data obtained, discussed the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the CCP "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation" under the agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Nogaeva U. V., Naumova A. A., Novinkov A. G., Flisyuk E. V., Burakova M. A., Shikov A. N., Abrosimova O. N. Comparative study of rheological properties of gels and creams on different carrier bases. *Drug development & registration*. 2022;11(3):121–129. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее важным параметром мягких лекарственных форм, контролируемым на этапе разработки, является изучение реологических характеристик, к которым относят динамическую и пластическую вязкость, предел текучести, степень и наличие тиксотропного эффекта [1–6].

В Государственной Фармакопее (ГФ) Российской Федерации XIV издания реологические показатели мягких лекарственных форм, согласно ОФС.1.4.1.0008.18 «Мази» не нормируются[1]. Однако известно, что существуют закономерности влияния реологических характеристик и температуры на биофармацевтические свойства лекарственной формы. Для сохранения данных свойств необходима тщательная организация системы контроля температурного режима и воздействия сдвиговых напряжений при производстве, транспортировке и хранении мягких лекарственных форм [7–12].

Удобство и легкость нанесения мази, геля, крема на ткани или слизистую ассоциируется у пациента с теми усилиями, которые он прилагает для распределения на поверхности кожи определенного количества мягкой лекарственной формы. Этот процесс аналогичен тому, который происходит во время сдвига вязко-пластичного материала в ротационном вискозиметре, а усилие, затрачиваемое пациентом, – не что иное, как напряжение сдвига, которое характеризует сопротивляемость материала сдвиговым деформациям при определенной скорости и может быть измерено инструментально [13–17].

[1] Государственная фармакопея XIV издания. Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-14-izdaniya/ Ссылка активна на 20.04.2022.

В ряде случаев представляет интерес изучение механических свойств, обусловленных внутренней структурой упруго-пластичных материалов – кремов, консистентных эмульсий, гелей, мазей, упруго-пластичных материалов и т. п. – в статическом режиме, при отсутствии механического перемещения слоев [3]. Практически и теоретически это имеет значение для:

1. Определения консистенции, густоты или жесткости материала, предела текучести в состоянии покоя, например, при хранении или технологической экспозиции.
2. Определения остаточного сопротивления материала (консистенции, густоты, предела текучести) после некоторого разрушения структуры, например, в процессе применения (намазывания мази или крема) или технологической обработки.
3. Изучения параметров релаксации напряжений (скорости и степени изменения) в материале и тиксотропного восстановления структуры после приложения определенной нагрузки [3].

Таким образом, изучение реологических свойств занимает особое место при разработке мягких лекарственных форм, так как они активно влияют на стабильность лекарственного препарата в процессе хранения, на его технологические и потребительские характеристики [7, 18–25].

Цель. Изучение основных реологических параметров разрабатываемых гелей и кремов на различных основах-носителях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Мелоксикам (CAS № 71125-38-7, АО «Активный Компонент», Россия), альгинат натрия (торговая марка «Protanal PH 1033», CAS № 9005-37-2 Ирландия), твин-80 (Tween® 80, CAS № 9005-65-6, Merck, Германия), пропиленгликоль (CAS № 57-55-6, АО «ЭКОС-1», Россия), кремофор торговой марки Kolliphor® RH 40 (CAS № 61791-12-6, Merck, Германия), глицерин (CAS № 56-81-5, АО «ЛенРеактив», Россия), эфирное масло лимона и апельсина (ООО «Олеос», Россия), карбопол 980 (CAS № 9003-01-4, Lubrizol, США), полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400) (CAS № 25322-68-3 ПАО «Нижнекамскнефтехим», Россия), калины обыкновенной кора (ООО «Компания Хорст», Россия), ромашки аптечной цветки (ООО «Грин Сайд», Россия), хлоргексидина биглюконата 20 % (№ PN002769/01, ООО «РОСБИО», Россия), ментол (CAS № 2216-51-5, ООО «НеваРеактив», Россия), сорбит (CAS № 50-70-4, ООО «НеваРеактив», Россия), масло кукурузное (ТУ 9141-028-70834238-13, ООО «Фабрика Органик Продукт», Россия), моноглицериды дистиллированные (МГД) (ТУ 9145-357-00334623-2003, ГК «НМЖК», Россия), спирт цетиловый торговой марки EMPROVE® (CAS № 36653-82-4, Merck, Германия), кокосовое масло (СТО 00336444.008-2015, ГК «НМЖК», Россия), салициловая кислота (CAS № 69-72-7, АО «ЛенРеактив», Россия), воск эмульсионный Remiwax 1001 (Россия), препарат ОС-20 (ГОСТ 10730-82, АО «ЛенРеактив», Россия), триэтаноламин (ТЭА) (ТУ 6-09-2448-91, АО «ЛенРеактив», Россия), эуксил PE9010 (LINDERA, Германия).

Методы

В лабораторных условиях были наработаны 3 образца мягких лекарственных форм массой по 100 г. Состав и описание образцов приведены в таблицах 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Состав образцов

Table 1. Composition of samples

№ образца Sample No.	Наименование компонента Component name	Количество, % Amount, %
1	Альгинат натрия Sodium alginate	2,00
	Пропиленгликоль Propylene glycol	10,00
	Твин-80 Twin-80	2,00
	Кремофор RH 40 Cremophor RH 40	2,00
	Мелоксикам Meloxicam	0,50
	Производное пурина Purine derivative	3,00
	Иммуномодулятор «М» Immunomodulator «M»	5,00
	Эфирное масло лимона Lemon essential oil	0,05
	Эфирное масло апельсина Orange essential oil	0,05
	Вода очищенная Purified water	до 100,00 up to 100.00
2	Карбопол 980 Carbopol 980	1,00
	Триэтаноламин (ТЭА) Trietanolamine	1,00
	Сухого экстракта калины обыкновенной коры Dry extract of common bark viburnum	1,00
	Сухого экстракта ромашки Dried chamomile extract	1,00
	ПЭГ-400 Polyethyleneglycol-400	2,00
	Хлоргексидина биглюконата 20 % Chlorhexidine bigluconate 20 %	0,05
	Ментол Menthol	0,03
	Сорбит Sorbite	2,00
	Вода очищенная Purified water	до 100,00 up to 100.00

№ образца Sample No.	Наименование компонента Component name	Количество, % Amount, %
3	Масло кукурузное Corn oil	5,00
	МГД Distilled monoglycerides	4,82
	Спирт цетиловый Cetyl alcohol	2,00
	Масло кокосовое Coconut oil	2,00
	Глицерин Glycerin	2,00
	Салициловая кислота Salicylic acid	1,50
	Воск эмульсионный Emulsion wax	1,37
	Препарат ОС-20 Product OS-20	1,01
	Триэтаноламин (ТЭА) Trietanolamine	1,00
	Эуксил PE 9010 Euxil PE 9010	0,50
	Вода очищенная Purified water	78,80

Таблица 2. Описание исследуемых образцов

Table 2. Description of Test Samples

№ образца Sample No.	Описание Description	Фото образца Sample photo
1	Однородный, непрозрачный гель светло-желтого цвета с зеленоватым оттенком и со слабым запахом эфирных масел A homogeneous, opaque gel of light yellow color with a greenish tint and with a weak odor of essential oils	
2	Однородная гелеобразная масса без посторонних включений светло-коричневого цвета с приятным мятным запахом с нотами ромашки и коры калины Homogeneous gel-like mass without foreign inclusions of light brown color with a pleasant mint aroma with notes of chamomile and viburnum bark	
3	Крем представляет из себя белую однородную структуру плотной консистенции, хорошо распределяется на коже, липкость отсутствует The cream is a white uniform structure of a dense consistency, it is well distributed on the skin, there is no stickiness	

Изучение реологических характеристик исследуемых образцов проводили через 24 часа после их приготовления методом вискозиметрии на вискозиметре Anton Paar DV-2P (Anton Paar GmbH, Австрия).

Реологические характеристики данных составов необходимо было оценить в условиях их хранения, поэтому все измерения проводили при температуре образцов 20 ± 1 °C. Для измерения использовали шпиндель L4 (точность ±1,0 % диапазона, воспроизводимость ±0,2 %). Образцы подвергали исследованию при 12 последовательно увеличивающихся скоростях, при этом регистрировались значения вязкости, как среднее четырех показаний в секунду. Скорость шпинделя в ходе эксперимента для образцов № 1 и 2 уменьшали от 50 об/с до 1 и обратно, а для образца №3 уменьшали от 50 об/с до 6 и обратно.

Исследования структурно-механических свойств образцов проводили на приборе, сконструированным в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете под руководством профессора, доктора фармацевтических наук В. А. Вайнштейна [3]. Прибор позволяет определять сопротивление структуры упруго-пластичного материала путем погружения в образец тестера (рисунок 1).



Рисунок 1. Прибор для измерения сопротивления структуры упруго-пластичных материалов

Figure 1. Resistance measuring device structures of elastic-plastic materials

Максимальное показание весов F (г), наблюдаемое в момент погружения тестера в материал, показывает силу, которая необходима для разрушения структуры $f_{структ.}$ в состоянии покоя, плюс архимедову силу выталкивания – вес вытесненного материала:

$$F = f_{структ.} + v_0 p, \quad (1)$$

где $v_0 p$ – вес вытесненного материала (сила Архимеда).

Из серии многочисленных опытов следует, что сила Архимеда $v_0 p = 1$ г, ввиду того, что вытесненный объем, как правило, составлял $v_0 = 1{,}0$ см^3, а плотность образца была равна $p = 1$ г/см^3. Тогда из уравнения 1 получается, что $f_{структ.} = (F - 1)$ г. При переходе от силы к напряжению σ (г/см^3) с учетом того, что сила (вес) распределяется на площади шток тестера, имеем следующее:

$$\sigma\ (г/см^3) = f_{структ.}\ (г)/\pi r^2,\ т.\ е.\ \sigma(г/см^3) = (F - 1)/1{,}54. \quad (2)$$

Напряжение должно быть выражено в системе СИ, то есть в Па [1 г силы/см^2 = 98,07 Па], таким образом, согласно уравнениям (1) и (2), напряжение сопротивления структуры σ в Па можно рассчитать по формуле:

$$\sigma\ (Па) = 98 \cdot \frac{(F-1)}{1{,}54} = 63{,}6 \cdot (F-1)\ Па. \quad (3)$$

После проведения измерений на экспериментальном приборе обработку результатов для каждой повторности выполняли по следующему алгоритму:

1. Корректировали записанные показания весов, убирая близкие и повторяющиеся значения *F* (г);
2. Строили зависимости силы от времени, наблюдая, что они адекватно аппроксимируются уравнением вида

$$y = -a \cdot \ln(x) + b.$$

3. Далее по формуле (3) рассчитывали значения напряжения сопротивления структуры и строили линейные зависимости σ (Па) от ln *t*. Было установлено, что анализ экспериментальных зависимостей вида:

$$\sigma = -k \cdot \ln t + \sigma_т, \quad (4)$$

позволяет определить важные характеристики упруго-пластичного материала. Так, свободный член ($\sigma_т$) показывает предел текучести (точка пересечения с осью ординат ($t = 1$ с, $\ln t = 0$). Скорость релаксации напряжений в массе равна коэффициенту *k*, отрицательное значение указывает, что напряжение в процессе измерения снижается.

4. Для расчета периода полурелаксации $t_{0,5}$, времени за которое напряжение σ снижалось в 2 раза использовали уравнение (4): $0{,}5\sigma = \sigma_т/2$, тогда $\ln t = \sigma_т/2k$, время (*t*) в секундах получали посредством расчета антилогарифма [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного эксперимента по изучению реологических свойств разработанных мягких лекарственных форм на различных основах-носителях представлены на рисунке 2.

В период разрушения структурированных систем (восходящая кривая) при помощи нарастающей скорости вращения внутреннего цилиндра происходит разжижение системы (уменьшение их вязкости), которое никогда не доходит до конца, так как некоторая доля связей обратимо восстанавливается даже при больших скоростях. Нисходящая кривая отражает способность системы к восстановлению при постепенном уменьшении скорости сдвига. Площадь, заключенная между восходящей и нисходящей кривой, называется петлей гистерезиса. По площади петли гистерезиса можно судить о механической устойчивости структурированных систем: чем она меньше, тем более механически устойчива система [26].

Таким образом, из исследуемых образцов наибольшей механической устойчивостью обладает образец № 1 (гель на основе альгината) и образец № 3 (крем). Наличие восходящих и нисходящих кривых петли гистерезиса указывает на то, что исследуемые образцы обладают тиксотропными свойствами. У образцов № 1 и 2 восходящая и нисходящая кривые течения накладываются друг на друга. Это

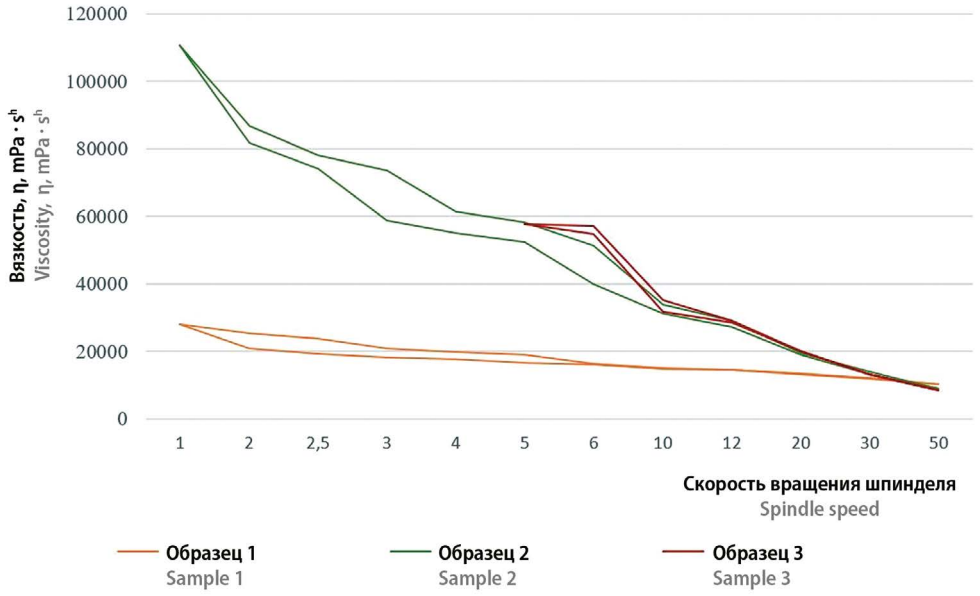


Рисунок 2. Петли гистерезиса изучаемых образцов, построенные при помощи вискозиметра

Figure 2. Hysteresis loops of the studied samples, constructed using a viscometer

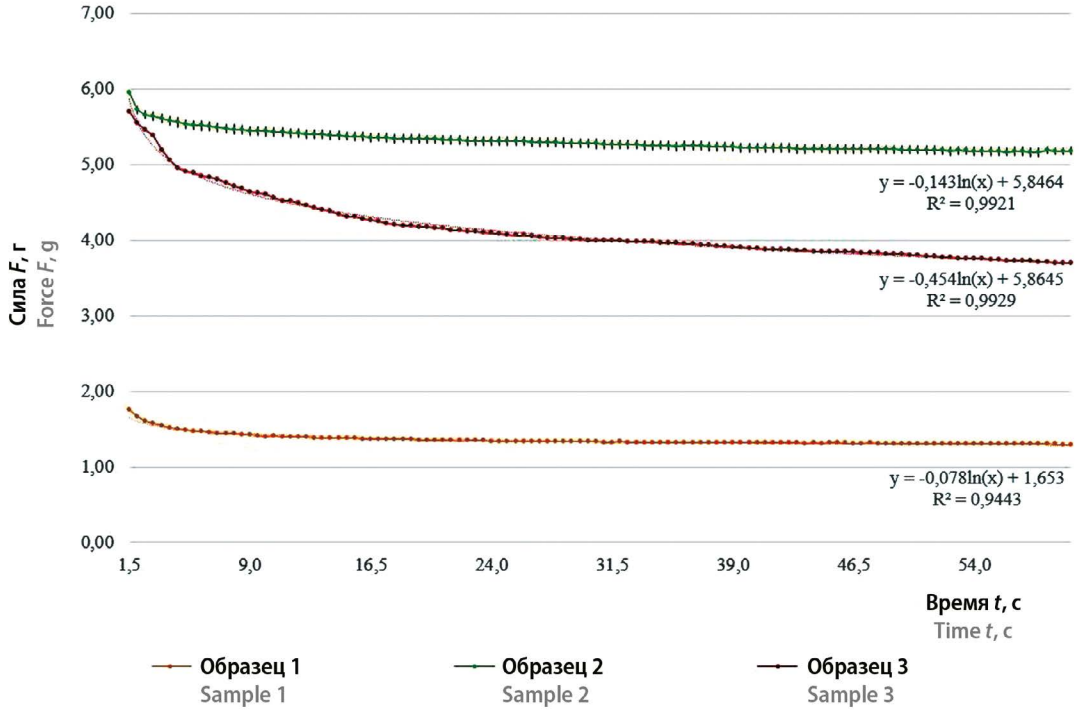


Рисунок 3. Изменение показания весов с момента погружения тестера в опытные образцы мягких лекарственных форм. По оси ординат – сила сопротивления (показания весов в г); по оси абсцисс – время в секундах

Figure 3. Change in the reading of the scales from the moment the tester is immersed in prototypes of soft dosage forms. On the y-axis – the resistance force (weight readings in g); along the abscissa – time in seconds

явление характерно для всех гелей и является их особенностью [26].

Данные исследования позволяют прогнозировать поведение исследуемых образцов после их приготовления в промышленных условиях на стадии фасовки в тубы, где они поддаются механическому воздействию при транспортировании и дозированию на высокопроизводительных тубонаполнительных аппаратах [26].

Определение структурно-механических свойств испытуемых образцов было выполнено на экспериментальном приборе в трех повторностях. На рисунке 3 приведены зависимости силы (показаний весов) от времени.

Как видно из рисунка 3, зависимости силы от времени адекватно аппроксимируются уравнением вида $y = -a \cdot \ln(x) + b$. Коэффициент a, отражающий скорость процесса, имеет знак «–», что указывает на снижение сопротивления в массе упруго-пластичного материала вследствии релаксации.

Для дальнейшего анализа и оценки результатов зависимости приведены к линейному виду и вместо показания весов отражены напряжения без вклада архимедовой силы (рисунок 4).

Из рисунка 4 следует, что релаксация структуры упруго-пластичного материала после деформации, вызванной введением штока тестера, происходит по логарифмическому закону. В состоянии покоя до введения штока тестера в материал структура не нарушена и масса образцов имеет максимальную густоту, то есть статическую вязкость. При введении штока тестера, то есть приложении напряжения, в массе происходит пластическая деформация, принудительное течение – напряжение в момент введения штока тестера отражает предел текучести. Далее при погруженном штоке тестера происходит тиксотропное восстановление разрушенных структурных связей. Такая закономерность в динамике сопротивления структуры наблюдается для структурированных (неньютоновских) жидкостей. Таким образом, данный тест позволяет сразу отличить структурированную систему от ньютоновской жидкости [3].

Величина предела текучести, измеряемая на данном приборе, может рассматриваться как статическая, или структурная, вязкость, в отличие от динамической вязкости, которая проявляется как трение движущихся слоев жидкости и измеряется на вискозиметрах с движущимися измерительными элементами [3].

Статистическая ошибка среднего из 3 измерений для образцов № 1, 2 и 3 составляет около 1, 2 и 1 % соответственно.

Свободный член линейного уравнения регрессии вида $\sigma = к \cdot \ln t + \sigma_т$ показывает предел текучести упруго-пластичного материала. Скорость релаксации напряжений в массе равна коэффициенту к, знак «–» указывает, что напряжение в процессе измерения

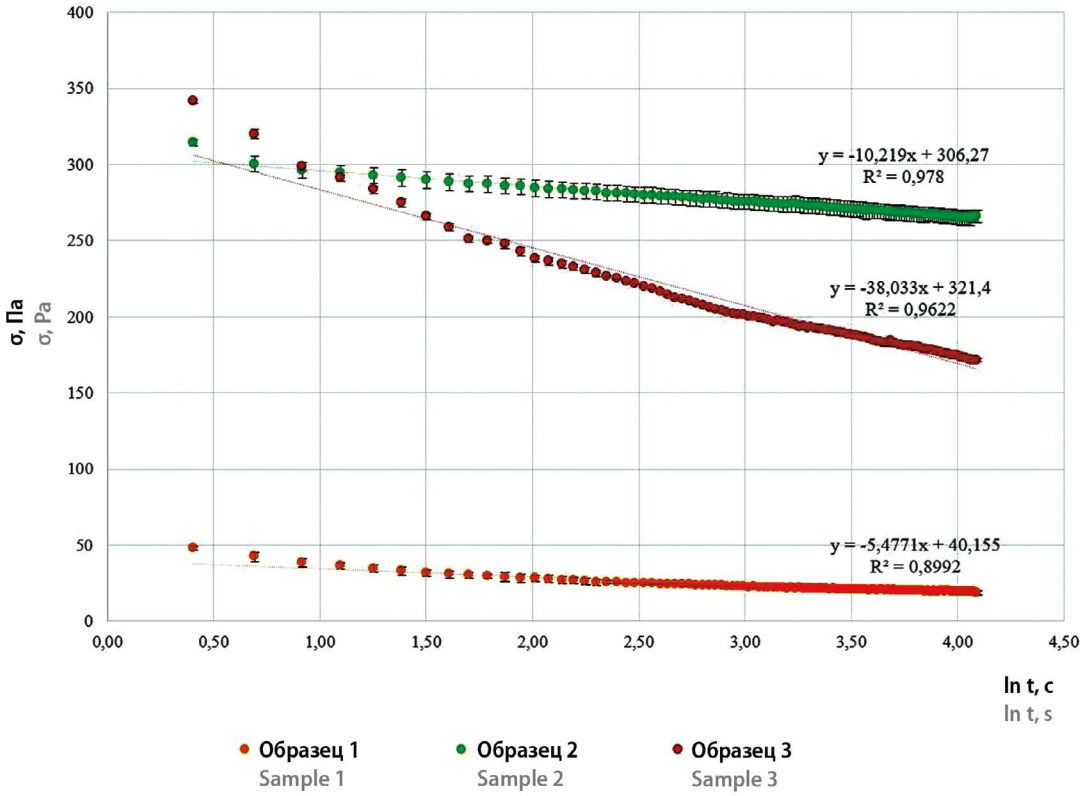


Рисунок 4. **Изменение напряжения опытных образцов с момента погружения тестера**

Figure 4. **Tension variation of studied samples after test-device introduction in the sample**

снижается. Как видно из таблицы 3, предел текучести, т. е. статическая вязкость мягкой лекарственной формы зависит от состава и возрастает в ряду: образец 1, образец 2, образец 3.

Рассчитанные ln $t_{0,5}$ характеризуют тиксотропное восстановление структуры после введения штока тестера, согласно полученным данным, предел текучести, то есть статическая вязкость составов, а также период полурелаксации зависят от природы и состава упруго-пластичного материала. Среди испытуемых составов, быстрее прочих восстанавливался образец 1, представляющий собой гель на основе альгината натрия, это может в дальнейшем использоваться для прогнозирования характера извлечения геля из тубы, а также распределения образца на коже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы реологические свойства трех экспериментальных образцов, изготовленных на разных основах-носителях. Для каждого образца были установлены пределы текучести, проанализированы их пластические и тиксотропные свойства. Показана необходимость проведения реологических исследований на стадии разработки лекарственных средств с целью прогнозирования и гарантирования качества

Таблица 3. **Структурно-механические свойства испытуемых составов**

Table 3. **Structural and mechanical properties of the tested compositions**

Испытуемый состав Test composition	**Уравнение регрессии** Regression Equation $\sigma = -k \cdot \ln t + \sigma_т$	**Коэффициент достоверности R^2** Confidence factor R^2	**$\sigma_т$, Па**	***k*, Па/ln *t***	**ln $t_{50\,\%}$ – время 50 % релаксации напряжений, с** ln $t_{50\,\%}$ – time of 50 % stress relaxation, s	**$t_{0,5}$ – время 50 % релаксации напряжений, с** $t_{0,5}$ – time of 50 % stress relaxation, s
Образец 1 Sample 1	$y_{ср.} = -5{,}477x + 40{,}155$	0,8992	40,155	–5,477	3,67	39,25
Образец 2 Sample 2	$y_{ср.} = -10{,}219 + 306{,}27$	0,978	306,27	–10,219	14,96	>870 часов >870 hours
Образец 3 Sample 3	$y_{ср.} = -38{,}033x + 321{,}4$	0,9622	321,4	–38,033	4,23	68,72

потребительских характеристик мягких лекарственных форм, а также установлена ее связь с технологией производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малкин А. Я., Исаев А. И. Реология: концепции, методы, приложения. СПб.: Профессия; 2010. 560 с.
2. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Барнолицкий Г. Г., Кречетов С. П. Обоснование реологических оптимумов при разработке мягких лекарственных форм на гидрофильной основе. стоматологические гели. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):124–128.
3. Вайнштейн В. А. Исследование структурно-механических свойств мягких лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):70–78.
4. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Подколзин А. М., Кречетов С. П. Определение реологических оптимумов вагинальных гелей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(2):46–51.
5. Tarasenko V., Pidlisnyy A., Koval A., Solomennyy A., Vaschuk V., Davtian L., Goncharenko N., Sakhanda I., Naumova M. Technological and Biopharmaceutical Aspects of Developingthe Basics of Soft Medicinal Local Action. *Archives of Pharmacy Practice*. 2020;11(1):92–99.
6. Ivko T., Hrytsenko V., Kienko L., Bobrytska L., Kukhtenko H., Germanyuk T. Investigation of the rheological properties of ointment bases as a justification of the ointment composition for herpes treatment. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;18(5):628–636. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.93457.
7. Пальвинский А. Г., Бахрушина Е. О., Синицына А. А., Кондратьева В. М., Краснюк И. И. Изучение реологических свойств стоматологических гелей берберина на основе полоксамеров и производных целлюлозы. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2021;4:105–111.
8. Mustafa A., Eser A., Aksu A.C., Kiraz A., Tanyeri M., Erten A., Yalcin O. A micropillar-based microfluidic viscometer for Newtonian and nonNewtonian fluids. *Analytica Chimica Acta*. 2020;1135:107–115. DOI: 10.1016/j.aca.2020.07.039.
9. Liu N., Zhang D., Gao H., Hu Y., Duan L. RealTime Measurement of Drilling Fluid Rheological Properties: A Review. *Sensors (Basel)*. 2021;21(11):3592. DOI: 10.3390/s21113592.
10. Морозов Ю. А., Макиева М. С., Морозова Е. В., Олисаев Э. Г. Изучение реологических свойств геля с лимонника китайского семян CO_2-экстрактом. *Актуальные проблемы медицины*. 2016;19(240):169–175.
11. Yunuskhodjayev A. N., Iskandarova S. F., Abdukhalilova N. S., Umarova S. Z. Study of the rheological properties of soft drug forms based on dry extracts of Curcuma longa L., and Ferula asafetida L. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 2020;7(3):3345–3361.
12. Kelly A. L., Gough T., Isreb M., Dhumal R., Jones J. W., Nicholson S., Dennis A. B., Paradkar A. In-process rheometry as a PAT tool for hot melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2018;44:670–676. DOI: 10.1080/03639045.2017.1408641.
13. Гладышев В. В., Кучина Л. К., Бурлака Б. С., Бирюк И. А. Исследование реологических свойств мягкой назальной лекарственной формы дилтиазема. *Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики*. 2013;1(11):69–72.
14. Романина Д. М., Гладишев В. В., Бурлака Б. С. Изучение реологических свойств мягкой лекарственной формы празиквантела для наружного применения. *Фармацевтический журнал*. 2016;1: 39–44.
15. Жамали К., Гладышев В. В., Лисянская А. П. Изучение структурно-механических свойств мазей с аминексилом. *Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики*. 2018;11(28):270–275.
16. Simões A., Miranda M., Cardoso C., Veiga F., Vitorino C. Rheology by Design: A Regulatory Tutorial for Analytical Method Validation. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):820. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090820.
17. Pleguezuelos-Villa M., Merino-Sanjuán M., Hernández Mª J., Nácher A., Peris D., Hidalgo I., Soler L., Sallan M., Merino V. Relationship between rheological properties, in vitro release and in vivo equivalency of topical formulations of diclofenac. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;572:118755. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118755.
18. Быковского С. Н., Василенко И. А., Деминой Н. Б., Шохина И. Е., Новожилова О. В., Мешковского А. П., Спицкого О. Р., ред. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо; 2015. 472 с.
19. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Кречетов С. П. Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(4):98–104.
20. Gupta S., Wang W. S., Vanapalli S. A. Microfluidic viscometers for shear rheology of complex fluids and biofluids. *Biomicrofluidics*. 2016;10(4):043402. DOI: 10.1063/1.4955123.
21. Sun Y., Perez A. F., Cardoza I. L., Baluyot-Reyes N., Ba Y. Mucoadhesive and rheological studies on the Co-Hydrogel systems of Poly(Ethylene Glycol) Copolymers with Fluoroalkyl and Poly(Acrylic Acid). *Polymers (Basel)*. 2021;13(12):1956. DOI: 10.3390/polym13121956.
22. Локарев А. В., Огай М. А., Сливкин А. И., Беленова А. С. Разработка и реологические исследования мазей с комплексным экстрактом из ЛРС. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2019;2:92–101.
23. Барсукова Ю. Н., Мельникова О. А. Мягкая лекарственная форма с наночастицами для остановки кровотечения: обоснование состава и технология получения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):48–54. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-48-54.
24. Kolpakova O. A., Kuchrenko N. V., Kukhtenko H. P. Research of rheological properties of ointment with water- soluble protein-polysaccharide complex of oyster mushroom. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019;11(5):1880–1883.
25. Kamal N. S., Krishnaiah Y. S. R., Xu X., Zidan A. S., Raney S., Cruz C. N., Ashraf M. Identification of critical formulation parameters affecting the in vitro release, permeation, and rheological properties of the acyclovir topical cream. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119914. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119914.
26. Кухтенко Г. П., Кухтенко А. С., Капсалямова Э. Н., Аюпова Р. Б., Сакипова З. Б. Реологические исследования мягких лекарственных средств. *Медицина*. 2014;1:6–9.

REFERENCES

1. Malkin A. Ya., Isaev A. I. Rheology: concepts, methods, applications. St. Petersburg: Profession; 2010. 560 p. (In Russ.)
2. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Barnolitskiy G. G., Krechetov S. P. Justification of the rheological optimum in the development of semisolid forms. dental gels. *Drug development & registration*. 2017;(2):124–128. (In Russ.)
3. Vainshtein V. A. Determination of structural-mechanical properties of soft drugs. *Drug development & registration*. 2017;(3):70–78. (In Russ.)
4. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Podkolzin A. M., Krechetov S. P. The determination of rheological optimum of vaginal gels. *Drug development & registration*. 2018;(2):46–51. (In Russ.)
5. Tarasenko V., Pidlisnyy A., Koval A., Solomennyy A., Vaschuk V., Davtian L., Goncharenko N., Sakhanda I., Naumova M. Technological and Biopharmaceutical Aspects of Developingthe Basics of Soft Medicinal Local Action. *Archives of Pharmacy Practice*. 2020;11(1):92–99.
6. Ivko T., Hrytsenko V., Kienko L., Bobrytska L., Kukhtenko H., Germanyuk T. Investigation of the rheological properties of ointment bases as a justification of the ointment composition for herpes treatment. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;18(5):628–636. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.93457.
7. Palvinsky A. G., Bakhrushina E. O., Sinitsyna A. A., Kondratyeva V. M., Krasnyuk I. I. Study of the rheological properties of berberin dental gels based on poloxamers and cellulose derivatives. *Bulletin of Voronezh State University, Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2021;4:105–111. (In Russ.)
8. Mustafa A., Eser A., Aksu A.C., Kiraz A., Tanyeri M., Erten A., Yalcin O. A micropillar-based microfluidic viscometer for Newtonian and nonNewtonian fluids. *Analytica Chimica Acta*. 2020;1135:107–115. DOI: 10.1016/j.aca.2020.07.039.

9. Liu N., Zhang D., Gao H., Hu Y., Duan L. RealTime Measurement of Drilling Fluid Rheological Properties: A Review. *Sensors (Basel)*. 2021;21(11):3592. DOI: 10.3390/s21113592.
10. Morozov Yu. A., Makieva M. S., Morozova E. V., Olisaev E. G., Izuchenie reologicheskikh svoistv gelya s limonnika kitaiskogo semyan CO2- ekstraktom. *Aktual'nye problemy meditsiny*. 2016;19(240):169–175. (In Russ.)
11. Yunuskhodjayev A. N., Iskandarova S. F., Abdukhalilova N. S., Umarova S. Z. Study of the rheological properties of soft drug forms based on dry extracts of Curcuma longa L., and Ferula asafetida L. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 2020;7(3):3345–3361.
12. Kelly A. L., Gough T., Isreb M., Dhumal R., Jones J. W., Nicholson S., Dennis A. B., Paradkar A. In-process rheometry as a PAT tool for hot melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2018;44(4):670–676. DOI: 10.1080/03639045.2017.1408641.
13. Gladyshev V. V., Kuchina L. K., Burlaka B. S., Biryuk I. A. Research of rheological properties of diltiazem soft nasal dosage form. *Topical issues of pharmaceutical and medical science and practice*. 2013;1(11):69–72. (In Russ.)
14. Romanina D. M., Gladishev V. V, Burlaka B. S. Study of the rheological properties of the soft dosage form of praziquantel for external use. *Pharmaceutical Journal*. 2016;1: 39–44. (In Russ.)
15. Zhamali K., Gladyshev V. V., Lisyanskaya A. P. Study of structural and mechanical properties of aminexyl ointments. *Topical issues of pharmaceutical and medical science and practice*. 2018;11(28):270–275. (In Russ.)
16. Simões A., Miranda M., Cardoso C., Veiga F., Vitorino C. Rheology by Design: A Regulatory Tutorial for Analytical Method Validation. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):820. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090820.
17. Pleguezuelos-Villa M., Merino-Sanjuán M., Hernández Mª J., Nácher A., Peris D., Hidalgo I., Soler L., Sallan M., Merino V. Relationship between rheological properties, in vitro release and in vivo equivalency of topical formulations of diclofenac. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;572:118755. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118755.
18. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B., Shokhina I. E., Novozhilova O. V., Meshkovsky A. P., Spitsky O. R., editors. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. Scientific and practical guidance for the pharmaceutical industry. Moscow: Pero; 2015. 472 p. (In Russ.)
19. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Krechetov S. P. Study of the matrix structure influence on the rheological characteristics of nimesulide oral gel experimental samples. *Drug development & registration*. 2016;(4):98–104. (In Russ.)
20. Gupta S., Wang W. S., Vanapalli S. A. Microfluidic viscometers for shear rheology of complex fluids and biofluids. *Biomicrofluidics*. 2016;10(4):043402. DOI: 10.1063/1.4955123.
21. Sun Y., Perez A. F., Cardoza I. L., Baluyot-Reyes N., Ba Y. Mucoadhesive and rheological studies on the Co-Hydrogel systems of Poly(Ethylene Glycol) Copolymers with Fluoroalkyl and Poly(Acrylic Acid). *Polymers (Basel)*. 2021;13(12):1956. DOI: 10.3390/polym13121956.
22. Lokarev A. V, Ogai M. A, Slivkin A. I, Belenova A. S. Development and rheological studies of ointments with complex extract from LRS. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2019;2:92–101. (In Russ.)
23. Barsukova Yu. N., Melnikova O. A. Soft Medical Form with Nanoparticles to Stop Bleeding: Substantiation of Composition and Technology of Obtaining. *Drug development & registration*. 2019;8(2):48–54. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-48-54.
24. Kolpakova O. A., Kuchrenko N. V., Kukhtenko H. P. Research of rheological properties of ointment with water- soluble protein-polysaccharide complex of oyster mushroom. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019;11(5):1880–1883.
25. Kamal N. S., Krishnaiah Y. S. R., Xu X., Zidan A. S., Raney S., Cruz C. N., Ashraf M. Identification of critical formulation parameters affecting the in vitro release, permeation, and rheological properties of the acyclovir topical cream. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119914. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119914.
26. Kukhtenko G. P., Kukhtenko A. S., Kapsalyamova E. N., Ayupova R. B, Sakipova Z. B. Rheological studies of soft drugs. *Medicine*. 2014;1: 6–9. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-130-135
УДК 615.012

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка состава комбинированных карандашей лекарственных для лечения стоматологических заболеваний

И. В. Алексеева[1]✉, Т. Е. Рюмина[1], В. В. Новикова[1], А. Л. Голованенко[1], Ю. М. Коцур[2], Л. В. Шигарова[2]

[1] ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Алексеева Ирина Владимировна. **E-mail:** irina2473@mail.ru

ORCID: 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; Ю. М. Коцур – https://orcid.org/0000-0001-9292-4240; Л. В. Шигарова – https://orcid.org/0000-0002-9578-6418.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 17.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Профилактика и лечение заболеваний пародонта остается одной из актуальных проблем современной медицины. По данным ВОЗ распространенность стоматологических заболеваний среди взрослого населения составляет 90–95 %, среди подростков – 80–83 %. От состояния полости рта во многом зависит здоровье организма в целом. Важное значение для эффективного лечения заболеваний имеет правильно выбранная лекарственная форма, которая обеспечивает и удобство применения, и целенаправленное использование действия содержащегося в ней фармакологически активного препарата. Карандаши лекарственные как лекарственная форма на фармацевтическом рынке представлена очень ограниченно, поэтому их разработка является актуальной. В качестве местноанестезирующего компонента в состав карандашей включен анилокаин в концентрации 5 %, антимикробное действие обеспечивается введением в состав метронидазола в концентрации 1 % с целью профилактики возникновения инфекции.

Цель. Обоснование состава и технологии карандаша лекарственного для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

Материалы и методы. Для исследования использовали карандаши лекарственные с активной фармацевтической субстанцией – анилокаин (ФС 42-2846-97, ООО «Пермская химическая компания», г. Пермь, срок хранения 5 лет), метронидазол (ФС 42-0257-07, АО «Медисорб», г. Пермь, срок хранения 3 года); основообразующие компоненты – ПЭО-400 (ФС 42-1242-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», г. Москва, срок хранения 3 года), ПЭО-1500 (ФС 42-1885-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», г. Москва, срок хранения 3 года), ПЭО-4000 (ФС 42-3337-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», г. Москва, срок хранения 3 года); вспомогательные вещества – вода очищенная (ФС.2.2.0020.18), полученная на установке обратного осмоса УВОИ-«МФ» 1812С6 (АО «НПК Медиана-Фильтр», Россия). В ходе исследований использовались технологические, структурно-механические и биофармацевтические методы.

Результаты и обсуждение. На основании технологических, структурно-механических и биофармацевтических исследований впервые предложен и обоснован состав карандашей лекарственных, обладающих анестезирующим, противовоспалительным и антимикробным действием для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта. Биофармацевтическая доступность карандашей лекарственных определена кондуктометрическим методом.

Заключение. Проведенный комплекс исследований позволит расширить ассортимент отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

Ключевые слова: пародонт, воспалительные заболевания полости рта, анилокаин, метронидазол, карандаш лекарственный

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: Алексеева И. В., Рюмина Т. Е., Новикова В. В., Голованенко А. Л., Коцур Ю. М., Шигарова Л. В. Разработка состава комбинированных карандашей лекарственных для лечения стоматологических заболеваний. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):130–135. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-130-135

Development of the Composition of Combined Medicinal Pencils for the Treatment of Dental Diseases

Irina V. Alekseeva[1]✉, Tatyana E. Ryumina[1], Valentina V. Novikova[1], Anna L. Golovanenko[1], Yulia M. Kotsur[2], Larisa V. Shigarova[2]

[1] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia
[2] Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

✉ **Corresponding author:** Irina V. Alekseeva. **E-mail:** irina2473@mail.ru

© Алексеева И. В., Рюмина Т. Е., Новикова В. В., Голованенко А. Л., Коцур Ю. М., Шигарова Л. В., 2022
© Alekseeva I. V., Ryumina T. E., Novikova V. V., Golovanenko A. L., Kotsur Yu. M., Shigarova L. V., 2022

ORCID: 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;
Yulia M. Kotsur – https://orcid.org/0000-0001-9292-4240; Larisa V. Shigarova – https://orcid.org/0000-0002-9578-6418.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 17.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Prevention and treatment of periodontal diseases remains one of the urgent problems of modern medicine. According to WHO, the prevalence of dental diseases among adults is 90–95 %, among adolescents – 80–83 %. The health of the body as a whole largely depends on the state of the oral cavity. It is important for the effective treatment of diseases to have a properly selected dosage form, which provides both convenience of use and purposeful use of the action of the pharmacologically active drug contained in it. Medicinal pencils as a dosage form are very limited on the pharmaceutical market, so their development is relevant. As a local anesthetic component, anilocaine is included in the composition of pencils at a concentration of 5 %, antimicrobial action is provided by the introduction of metronidazole in a concentration of 1 % in order to prevent the occurrence of infection.

Aim. Substantiation of the composition and technology of the medicinal pencil for the treatment and prevention of infectious and inflammatory diseases of the oral cavity.

Materials and methods. For the study, we used medicinal pencils with an active pharmaceutical substance – anilocaine (FS 42-2846-97, LLC "Perm Chemical Company", Perm, shelf life of 5 years), metronidazole (FS 42-0257-07, JSC "Medisorb", Perm, shelf life of 3 years); basic components – PEO-400 (FS 42-1242-96, LLC "Neftegazkhimkomplekt", Moscow, shelf life of 3 years), PEO-1500 (FS 42-1885-96, LLC "Neftegazkhimkomplekt", Moscow, shelf life of 3 years), PEO-4000 (FS 42-3337-96, LLC "Neftegazkhimkomplekt", Moscow, shelf life 3 years), second ingredient – purified water (FS.2.2.0020.18), the UVOI-"MF" 1812S6 obtained at the reverse osmosis plant (JSC "NPK Median-Filter", Russia). In the course of the research, technological, structural-mechanical and biopharmaceutical methods were used.

Results and discussion. Based on technological, structural-mechanical and biopharmaceutical studies, the composition of medicinal pencils with anesthetic, anti-inflammatory and antimicrobial effects for the treatment and prevention of infectious and inflammatory diseases of the oral cavity is proposed and justified for the first time. Biopharmaceutical availability of medicinal pencils is determined by the conductometric method.

Conclusion. The conducted complex of studies will expand the range of domestic medicines for the treatment and prevention of infectious and inflammatory diseases of the oral cavity.

Keywords: periodontitis, inflammatory diseases of the oral cavity, anylocaine, metronidazole, medicinal pencil

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: Alekseeva I. V., Ryumina T. E., Novikova V. V., Golovanenko A. L., Kotsur Yu. M., Shigarova L. V. Development of the composition of combined medicinal pencils for the treatment of dental diseases. *Drug development & registration*. 2022;11(3):130–135. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-130-135

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач фармацевтической промышленности в настоящее время является всестороннее и полное удовлетворение потребностей населения в лекарственных средствах (ЛС) отечественного производства, что определяет необходимость расширения исследований по изысканию новых препаратов, обладающих широким спектром фармакологического действия и минимальной токсичностью.

В последние десятилетия во всем мире прослеживается тенденция роста заболеваний пародонта, поэтому вопросы профилактики составляют основной раздел стоматологии[1] [1–5, 15–23].

Важное значение для эффективного лечения заболеваний имеет правильно выбранная лекарственная форма (ЛФ), которая обеспечивает и удобство применения, и целенаправленное использование действия содержащегося в ней фармакологически активного препарата. В настоящее время фармацевтическая промышленность предлагает широкий ассортимент лекарственных форм для терапии заболеваний слизистой оболочки полости рта, но отсутствует комбинированное средство, в котором противовоспалительное действие сочетается с высокой местноанестезирующей активностью [6].

Карандаши лекарственные как ЛФ на фармацевтическом рынке представлена очень ограниченно, поэтому их разработка является довольно актуальной [7–8].

В качестве местноанестезирующего компонента в состав карандаша лекарственного включен анилокаин – высокоэффективный отечественный местный анестетик, синтез которого осуществлен в Пермской государственной фармацевтической академии [19]. По сравнению с имеющимися анестетиками анило-

[1] Introduction to hypersensitivity and inflammatory skin disorders. *MSD MANUAL Consumer Version.* Avaliable at: https://www.msdmanuals.com. Accessed 12.09.2021.

каин имеет ряд значительных преимуществ: выраженное анестезирующее действие, а также противовоспалительную и умеренную антимикробную активность. Препарат относительно малотоксичен и имеет достаточную широту терапевтического действия. Такое сочетание комплекса проявляемых фармакологических свойств наиболее ценно для разработки на его основе лекарственных форм, применение которых позволяет снизить уровень аллергических реакций, пролонгировать лечебный эффект и увеличить скорость всасывания лекарственного средства.

Цель исследования: обоснование состава и технологии карандаша лекарственного для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Активная фармацевтическая субстанция (АФС) – анилокаин (ФС 42-2846-97, ООО «Пермская химическая компания», г. Пермь, срок хранения 5 лет), метронидазол (ФС 42-0257-07, АО «Медисорб», г. Пермь, срок хранения 3 года); основообразующие компоненты – ПЭО-400 (ФС 42-1242-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», г. Москва, срок хранения 3 года), ПЭО-1500 (ФС 42-1885-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», г. Москва, срок хранения 3 года), ПЭО-4000 (ФС 42-3337-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», г. Москва, срок хранения 3 года); вспомогательные вещества – вода очищенная (ФС.2.2.0020.18).

Оборудование: аналитические весы HR-150AG (AND, Корея); кондуктометр марки АНИОН 4100 (ООО НПП «Инфраспак-Аналит», Россия), преобразователь ионометрический И-500 № 2549 (НПКФ «Аквилон», Россия), термометр лабораторный стеклянный ТЛС-5, 0–100 °С, № 00364.

Методы

Органолептический контроль заключается в проверке внешнего вида, цвета, запаха и однородности. Однородность оценивали визуально по продольному срезу карандаша.

Кроющую способность определяли визуально, для чего наносили карандашом полосу площадью 2 см^2 на лист фильтровальной бумаги трижды на одно и то же место. Покрытие (нанесенный слой) просматривали на однородность, отсутствие крошек и неровностей, взвешивали на аналитических весах. Стирание имитировали путем накладывания на подложку фильтровальной бумаги и прокатывания по ней груза массой 500 г.

Процент нанесения (стойкость) рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{m - m_2}{m - m_1} \cdot 100\ \%.$$

где m – начальная масса подложки с нанесенным слоем, г; m_1, m_2 – соответственно масса подложки без покрытия и с нанесенным покрытием после стирания, г [8].

Для определения *намазываемости* образцы карандашей по 1,0 г помещали на стеклянные пластинки 10×10, накрывали вторыми стеклянными пластинками, предварительно измерив диаметр карандашей. После этого на все стеклянные пластинки с карандашами помещали груз – гирю 1 кг. Карандаши под действием тяжести груза расходились, образовывая пятна определенного диаметра. Через 10 минут измеряли диаметр каждого карандаша. Согласно методике, чем диаметр карандаша больше, тем более мягкую консистенцию имеет карандаш и, следовательно, легче намазывается [7].

Для кинетического исследования процесса высвобождения действующих веществ применяли физико-химический метод анализа – кондуктометрический, основанный на изучении электрической проводимости проводников ионного типа: на дно цилиндра (объемом 150 см^3) помещали карандаш, предварительно взвесив, добавляли 100 мл воды очищенной, опускали платиновые электроды, подключенные к кондуктометру. Уровень жидкости должен превышать верхние края электродов. В ходе эксперимента система термостатировалась. Интервал температур составлял от 293 до 333 К, что обеспечивалось использованием контактного термометра. Через определенные промежутки времени измеряли удельную электрическую проводимость (æ, См $\times$ м$^{-1}$). Замеры проводили с перемешиванием акцепторной фазы и без. По результатам эксперимента рассчитывали зависимость электрической проводимости от времени.

Водородный показатель определяли потенциометрическим методом согласно ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия»[1].

Противогрибковую активность определяли согласно ОФС.1.2.4.0010.15 методом диффузии в агар, модифицированным с учетом специфики ЛФ, используя в качестве тест-культуры *Candida albicans* (штамм ATCC 885-653).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной этап исследования связан с выбором оптимального состава основы карандашей лекарственных [9–12]. С целью выбора основы изучено 18 композиций. Для определения оптимальной концентрации предварительно проведена визуальная оценка композиций, в результате которой отбракована часть образцов, ввиду отсутствия возможности формования, невозможности извлечения форм без

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 28.10.2021.

деформации, возникновения трещин и воздушных полостей.

Окончательный выбор основы проводили на основании изучения структурно-механических свойств (кроющей способности и намазываемости), которые тесно связаны с интенсивностью высвобождения и всасывания ЛС [7]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты определения намазываемости и кроющей способности

Table 1. Results of determining the spreadability and covering ability

№ состава № composition	Намазываемость, диаметр карандаша, мм Spreadability, pencil diameter, mm		Кроющая способность, % нанесения Covering ability, % of application
	начальный primary	после воздействия груза after exposure to the cargo	
1	9	38	21,64
2	9	21	20,52
3	10	19	14,34
4	10	40	12,5
5	8	22	17,23
6	8	33	18,11
7	9	19	17,2

На основании полученных результатов определения внешнего вида, намазываемости и кроющей способности выбраны лидеры – образцы на основе комбинаций полиэтиленоксидов (ПЭО), так они имели большее значение кроющей способности и более мягкую, эластичную консистенцию [20, 23].

При разработке состава и технологии карандашей с анилокаином учитывали общие требования, которые предъявляют клиницисты к анестезирующим ЛС: быстрота наступления, глубина и продолжительность анестезии, полное отсутствие или малая токсичность, безболезненность при нанесении, стабильность при хранении. Выбирая концентрацию анестетика мы ориентировались на ранее проведенные исследования [13], которые показали, что для обеспечения анестезирующего эффекта в стоматологии достаточной является концентрация 5 %.

Также в состав карандаша лекарственного целесообразно введение компонента, обладающего противогрибковым действием – метронидазола [21]. Согласно, литературным данным, возможно его применение в концентрациях 0,75 % и 1 % Эти концентрации выбраны для исследования в отношении тест-культуры Candida albicans [22]. Результаты исследований показали, что наибольшую противогрибковую активность метронидазол проявляет в концентрации 1 % [6, 14].

Следующий этап работы посвящен биофармацевтическим исследованиям. Кинетические исследования высвобождения действующих веществ, проводимые кондуктометрическим методом, показали, что при равных условиях проведения эксперимента значение удельной электропроводимости возрастает, то есть увеличивается количество высвобождаемых ионов в воду. По данным кинетических исследований определены порядок реакции и константы скорости растворения. В нашем случае наблюдалась линейная зависимость в координатах $\ln(к_{max} - к_i) = f(t)$, что соответствует реакции первого порядка (рисунок 1).

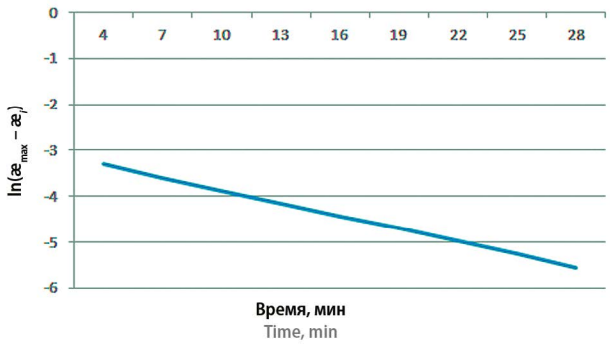


Рисунок 1. Зависимость $\ln(æ_{max} - æ_i)$ от времени

Figure 1. The dependence of $\ln(æ_{max} - æ_i)$ on time

Таким образом, по результатам изучения органолептических свойств, структурно-механических, биофармацевтических, микробиологических исследований при разработке оптимального состава карандашей лекарственных для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний пародонта предложен следующий состав (состав указан на 1 карандаш массой 2,5, г):

- Анилокаина 0,125.
- Метронидазола 0,005.
- ПЭО-400 0,99.
- ПЭО-1500 0,69.
- ПЭО-4000 0,69.

По внешнему виду карандаш лекарственный имеет цилиндрическую форму белого цвета.

Одним из основных факторов, обеспечивающим качество ЛФ, ее терапевтическую активность и стабильность, является рациональная технология. Карандаши лекарственные получали методом выливания в соответствии с правилами изготовления и санитарно-эпидемиологическими требованиями, исходя из свойств входящих в состав ингредиентов.

Особое внимание в разработке карандашей лекарственных представляет показатель значения pH, который относится к объективным показателям качества, но при этом дает результат субъективной характеристики в виде определённых ощущений при нанесении на слизистую оболочку полости рта. Данный показатель позволяет прогнозировать раздражающее действие ЛФ. Определение pH проводили потенциометрическим методом. В ходе эксперимента фиксировали значение pH водных растворов, которые готовили с учетом физико-химических свойств исследуемых образцов. Определяли среднее значе-

ние pH из 5 результатов параллельных измерений. Результаты эксперимента представленные в таблице 2, показали, что среднее значения pH составило в пределах 5,69, что соответствует pH ротовой полости.

Таким образом, на основании технологических, структурно-механических, биофармацевтических и физико-химических исследований разработан состав и технология карандаша лекарственного для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

Таблица 2. Результаты определения pH карандашей лекарственных

Table 2. Results of determining the pH of medicinal pencils

Номер серии Serial number	Метрологические характеристики Metrological characteristics		
	$\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}_{\alpha}$	ε, %
1	5,69	0,11	1,9

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований позволит расширить ассортимент отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nazir M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention: A Review. *International journal of health science*. 2017;11(2):72–80.
2. Bruni N., Della P. C., Oliaro-Bosso S., Pessione E., Gastaldi D., Dosio F. Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. *Molecules*. 2018;23(10):2478. DOI: 10.3390/molecules23102478.
3. Usui M., Onizuka S., Sato T., Kokabu S., Ariyosh W., Nakashima K. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis – Periodontal bacteria and inflammation: A Review. *Japanese Dental Science Review*. 2021;57:201–208. DOI: 10.1016/j.jdsr.2021.09.005.
4. Морозова С. В., Павлюшина Е. М. Топическая терапия сочетанных воспалительных заболеваний глотки и ротовой полости. *Медицинский совет*. 2019;(8):18–27. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-8-18-27.
5. Minic I., Pejcic A., Popovic S. Link between periodontal inflammatory diseases and Parkinson's disease: Case report. *GSC Advanced Research and Reviews*. 2020;5(2):84-88. DOI: 10.30574/gscarr.2020.5.2.0096.
6. Dighriri I., Mobarki A., Althomali N., Alqurashi K., Daghriri O., Howimel B. B., Alhamad I., Alsaadi R., Alsufyani M., Balobade M., Altermani R., Alatawi B., Sharoufna W., Almuntashiri T., Almushawwah S. Detect drug interactions with metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021:33(47):597–604. DOI: 10.9734/jpri/2021/v33i47A33049.
7. Алешникова К. Ю., Джавахян М. А. Технологические аспекты разработки карандашей лекарственных с эвкалимином. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019;22(3):37–41. DOI**:** 10.29296/25877313-2019-03-06.
8. Алешникова К. Ю., Дул В. Н., Джавахян М. А., Семкина О. А. Разработка и стандартизация карандашей лекарственных с эвкалимином. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):99–106. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-99-106.
9. Загорулько Е. Ю., Теслев А. А. Гели для приема внутрь. Часть 1. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):42–48.
10. 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.
11. 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.
12. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):627–34. DOI: 10.1007/s11094-015-1342-5.
13. Алексеева И. В. Комплексные исследования с целью создания лекарственных форм для лечения раневых и воспалительных процессов на основе местноанестезирующего средства: Дисс. ... д-р фарм. наук. Пермь; 2009. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/kompleksnye-issledovaniya-s-tselyu-sozdaniya-lekarstvennykh-form-dlya-lecheniya-ranevykh-i-v. Ссылка активна на 12.09.2021.
14. Казеко Л. А. Противомикробная терапия при заболеваниях периодонта. *Современная стоматология*. 2016;2:14–18.
15. Popova N. V., Arsenina O. I., Gavrilova M. V., Glukhova N. V. Objective and subjective assessment of the quality and effectiveness of orthodontic treatment. *Stomatologiia*. 2021;100(5):82–87. DOI: 10.17116/stomat202110005182.
16. Eroshenko R. E., Stafeev A. A. Analysis of the prevalence of dental diseases requiring prosthodontic treatment among the rural population of the Omsk region. *Stomatologiia*. 2018;97(1):9–15. DOI: 10.17116/stomat20189719-15.
17. Vislobokova E. V., Kiselnikova L. P., Lezhnev D. A., Murtazaev S. S. Periodontal status evaluation in adolescents with hereditary rickets-like diseases. *Stomatologiia*. 2021;100(6):63–69. DOI: 10.17116/stomat202110006163.
18. Balmasova I. P., Tsarev V. N., Yushchuk E. N., Dorovskikh A. S., Malova E. S., Karakov K. G., Elbekyan K. S., Arutyunov S. D. Periodontal diseases and atherosclerosis: Microecological, metabolic and immunological mechanisms of interconnection. *Immunologiya*. 2021;41(4):370–380. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-4-370-380.
19. Alekseeva I. V., Ruymina T. E. Biopharmaceutical aspects of creating dental gel anylocaine. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2019;11(5):46–52.
20. Binguyan L., Xuhong Y. Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. *Materials Science and Engineering C*. 2020;109:110601. DOI:10.1016/j.msec.2019.110601.
21. Wallner J., Rieder M., Schwaiger M., Pau M., Zrnc T., Zemann W., Metzler P. Metronidazole – spectrum of activity, use and side effects. *Swiss dental journal*. 2022;132(6):433-435.
22. Razina I. N., Chesnokova M. G., Nedosenko V. B. The relevance of Candida spp. in chronic periodontal disease. *Stomatologiia*. 2017;96(4):4–6. DOI: 10.17116/stomat20179644-6.
23. Paradowska-Stolarz A., Wieckiewicz M., Owcrazek A., Wezgowiec J. Natural polymers for the maintenance of oral health: Review of recent advances and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10337. DOI: 10.3390/ijms221910337.

REFERENCES

1. Nazir M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention: A Review. *International journal of health science*. 2017;11(2):72–80.
2. Bruni N., Della P. C., Oliaro-Bosso S., Pessione E., Gastaldi D., Dosio F. Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. *Molecules*. 2018;23(10):2478. DOI: 10.3390/molecules23102478.
3. Usui M., Onizuka S., Sato T., Kokabu S., Ariyosh W., Nakashima K. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis – Periodontal bacteria and inflammation: A Review. *Japanese Dental Science Review*. 2021;57:201–208. DOI: 10.1016/j.jdsr.2021.09.005.
4. Morozova S. V., Pavlyshina E. M. Topical therapy of combined inflammatory diseases of the pharynx and oral cavity. *Medical Council*. 2019;(8):18–27. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2019-8-18-27.

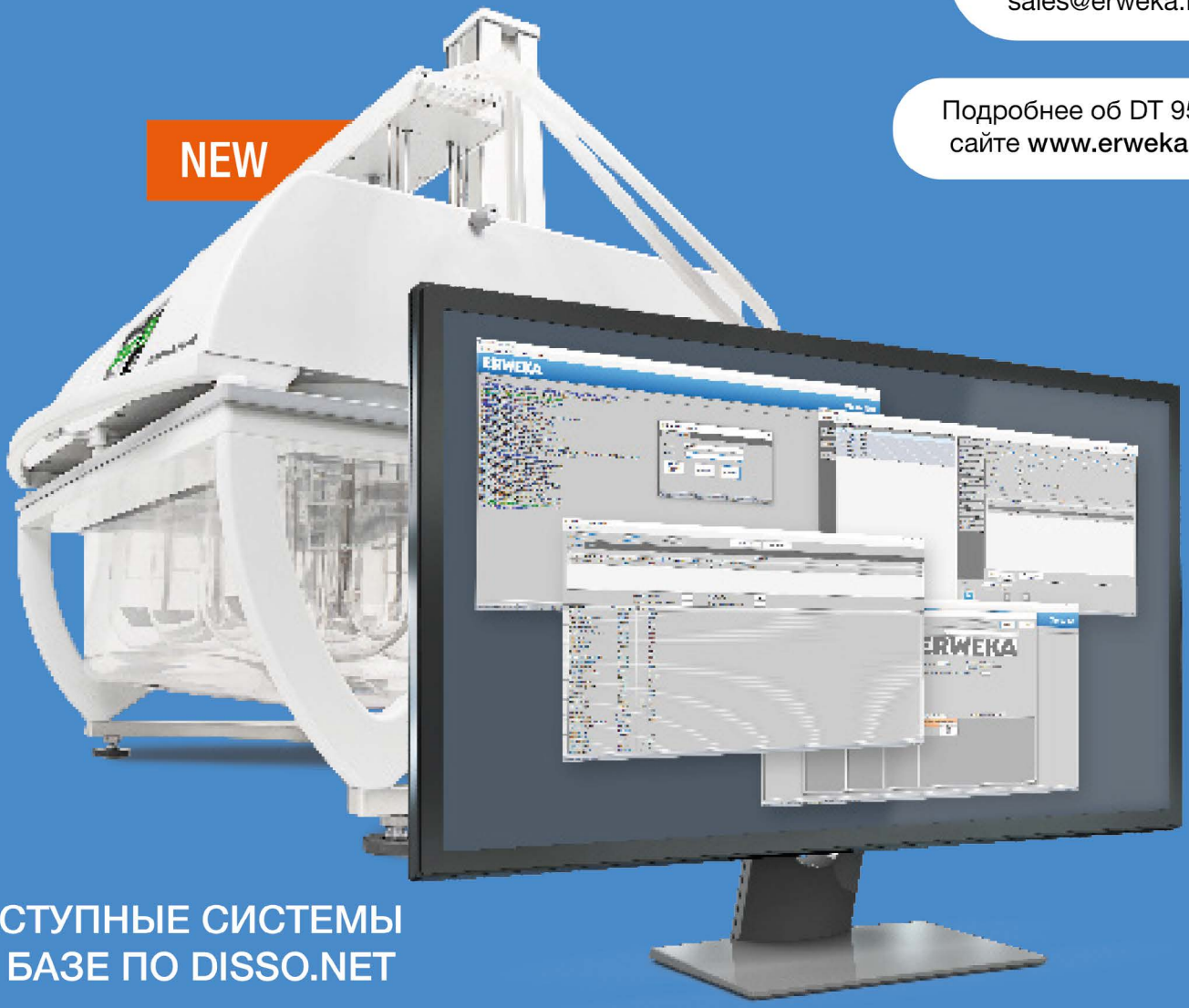
5. Minic I., Pejcic A., Popovic S. Link between periodontal inflammatory diseases and Parkinson's disease: Case report. *GSC Advanced Research and Reviews*. 2020;5(2):84-88. DOI: 10.30574/gscarr.2020.5.2.0096.
6. Dighriri I., Mobarki A., Althomali N., Alqurashi K., Daghriri O., Howimel B. B., Alhamad I., Alsaadi R., Alsufyani M., Balobade M., Altermani R., Alatawi B., Sharoufna W., Almuntashiri T., Almushawwah S. Detect drug interactions with metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021:33(47):597–604. DOI: 10.9734/jpri/2021/v33i47A33049.
7. Aleshnikova K. Yu., Javakhyan M. A. Technological aspects of the development of medicinal pencils with eucalymin. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2019;22(3):37–41. (In Russ.) DOI**:** 10.29296/25877313-2019-03-06.
8. Aleshnikova K. Yu., Dul V. N., Dzhavakhyan M. A., Semkina O. A. Development and standardization of crayons with eucalimine. *Drug development & registration*. 2020;9(4):99–106. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-99-106.
9. Zagorulko E. Yu., Teslev A. A. Gels For Oral Administration. Part 1. Medical products and dietary supplements (review). *Drug development & registration*. 2017;(3):42–48. (In Russ.)
10. 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.
11. 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.
12. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):627**–**34. DOI: 10.1007/s11094-015-1342-5.
13. Alekseeva I. V. Comprehensive studies to create dosage forms for the treatment of wound and inflammatory processes based on a local anesthetic [dissertation]. Perm; 2009. Available at: https://www.dissercat.com/content/kompleksnye-issledovaniya-s-tselyu-sozdaniya-lekarstvennykh-form-dlya-lecheniya-ranevykh-i-v. Accessed: 12.09.2021. (In Russ.)
14. Kazeko L. A. Antimicrobial therapy for periodontal diseases. *Sovremennaya stomatologiya*. 2016;2:14–18. (In Russ.)
15. Popova N. V., Arsenina O. I., Gavrilova M. V., Glukhova N. V. Objective and subjective assessment of the quality and effectiveness of orthodontic treatment. *Stomatologiia*. 2021;100(5):82–87. DOI: 10.17116/stomat202110005182.
16. Eroshenko R. E., Stafeev A. A. Analysis of the prevalence of dental diseases requiring prosthodontic treatment among the rural population of the Omsk region. *Stomatologiia*. 2018;97(1):9–15. DOI: 10.17116/stomat20189719-15.
17. Vislobokova E. V., Kiselnikova L. P., Lezhnev D. A., Murtazaev S. S. Periodontal status evaluation in adolescents with hereditary rickets-like diseases. *Stomatologiia*. 2021;100(6):63–69. DOI: 10.17116/stomat202110006163.
18. Balmasova I. P., Tsarev V. N., Yushchuk E. N., Dorovskikh A. S., Malova E. S., Karakov K. G., Elbekyan K. S., Arutyunov S. D. Periodontal diseases and atherosclerosis: Microecological, metabolic and immunological mechanisms of interconnection. *Immunologiya*. 2021;41(4):370–380. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-4-370-380.
19. Alekseeva I. V., Ruymina T. E. Biopharmaceutical aspects of creating dental gel anylocaine. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2019;11(5):46–52.
20. Binguyan L., Xuhong Y. Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. *Materials Science and Engineering C*. 2020;109:110601. DOI:10.1016/j.msec.2019.110601.
21. Wallner J., Rieder M., Schwaiger M., Pau M., Zrnc T., Zemann W., Metzler P. Metronidazole – spectrum of activity, use and side effects. *Swiss dental journal*. 2022;132(6):433-435.
22. Razina I. N., Chesnokova M. G., Nedosenko V. B. The relevance of Candida spp. in chronic periodontal disease. *Stomatologiia*. 2017;96(4):4–6. DOI: 10.17116/stomat20179644-6.
23. Paradowska-Stolarz A., Wieckiewicz M., Owcrazek A., Wezgowiec J. Natural polymers for the maintenance of oral health: Review of recent advances and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10337. DOI: 10.3390/ijms221910337.

Новые системы растворения

на базе DT 950 и ПО Disso.NET

Демонстрация
по запросу на
sales@erweka.ru

Подробнее об DT 950 на
сайте **www.erweka.ru**



ДОСТУПНЫЕ СИСТЕМЫ НА БАЗЕ ПО DISSO.NET

- Офлайн система
- Онлайн система
- Он/офлайн система с UV-Vis
- Он/офлайн система с HPLC

Аналитические методы

100% Соответствие USP/EP/ГФ РФ

Disso.NET Полный контроль ПО Disso.NET

ООО „ЭРВЕКА“

115114 Москва
Летниковская 16-103

E-Mail: sales@erweka.ru
Тел.: +7 499 110 90 60

ERWEKA

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151
УДК 615.1; 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Нормирование остаточных фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье (обзор)

О. В. Фатеенкова✉, А. М. Савватеев, В. Л. Белобородов, И. В. Гравель

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

✉ **Контактное лицо:** Фатеенкова Ольга Владимировна. **E-mail:** Fateenkova-olga@mail.ru

ORCID: О. В. Фатеенкова – https://orcid.org/0000-0002-0076-5498; А. М. Савватеев – https://orcid.org/0000-0002-3679-977X;
В. Л. Белобородов – https://orcid.org/0000-0003-2700-5664; И. В. Гравель – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291.

Статья поступила: 22.12.2021 **Статья принята в печать:** 28.03.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Использование фосфорорганических пестицидов (ФОП) в сельском хозяйстве, в том числе и при выращивании лекарственных растений – необходимая мера для получения стабильного урожая. Для поддержания высокого уровня безопасности фитопрепаратов в разных странах разработаны нормативные документы, которые регламентируют предельно допустимое содержание пестицидов (в том числе и фосфорорганических) в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и методы их анализа.

Текст. Проведено информационно-аналитическое исследование пределов допустимого содержания ФОП в ЛРС и пищевой продукции, а также методов экстрагирования и анализа этой группы пестицидов в ГФ РФ XIV, международных фармакопеях, материалах ВОЗ и нормативной документации на пищевую продукцию. Приведена физико-химическая характеристика ФОП и основной механизм их токсического действия на организм человека. Показано, что ВЭЖХ-МС и ГХ-МС являются наиболее перспективными аналитическими методами определения ФОП в ЛРС.

Заключение. В информационно-аналитическом обзоре дана физико-химическая характеристика ФОП, описан токсический механизм действия данной группы пестицидов на человека, представлена обобщенная сводка пределов допустимого содержания ФОП в ЛРС и ряде пищевых источников. Выявлено, что в большинстве современных фармакопейных изданий нормирование содержания ФОП гармонизировано. Представлены современные способы обнаружения ФОП в ЛРС и пищевой продукции. Отмечено преимущество современного подхода нормирования ФОП в ЛРС – определение содержания индивидуального пестицида в сумме с его токсичными метаболитами. Ключевым вопросом является необходимость разработки чувствительных и селективных методик анализа ФОП в соответствии с физико-химическими свойствами данных групп пестицидов в различных видах ЛРС и фитопрепаратах.

Ключевые слова: фосфорорганические пестициды, лекарственное растительное сырье, стандартизация, нормативная документация

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

Вклад авторов. О. В. Фатеенкова занималась переводом собранной иностранной литературы. А. М. Савватеев разработал и сформировал рисунки и таблицы. Все авторы участвовали в сборе и обработке информации данных научной литературы и нормативной документации, написании статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Фатеенкова О. В., Савватеев А. М., Белобородов В. Л., Гравель И. В. Нормирование остаточных фосфорорганических пестицидов в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(3):137–151. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151

Rationing of Residual Organophosphate Pesticides in Herbal Substances (Review)

Olga V. Fateenkova✉, Alexey M. Savvateev, Vladimir L. Beloborodov, Irina V. Gravel

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

✉ **Corresponding author:** Olga V. Fateenkova. **E-mail:** Fateenkova-olga@mail.ru

ORCID: Olga V. Fateenkova – https://orcid.org/0000-0002-0076-5498; Alexey M. Savvateev – https://orcid.org/0000-0002-3679-977X;
Vladimir L. Beloborodov – https://orcid.org/0000-0003-2700-5664; Irina V. Gravel – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291.

Received: 22.12.2021 **Revised:** 28.03.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Usage of organophosphate pesticides (OPPs) in agriculture, including farming of medical herbs, is a necessary measure for producing regular harvest. In order to maintain an adequate degree of herbal medicines security a variety of countries developed normative documents that regulate the limits of proportion of pesticides (including OPPs) in herbal substances. These documents contain the recommended methods of residual pesticides analysis as well.

Text. The article describes the recently conducted information-analytical research of limits of permissible proportion of OPPs in herbal substances and food production and of methods of extraction and analysis of OPPs mentioned in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV, international pharmacopeias, WHO information sources and the normative documents on food production. The authors specify physical-chemical characteristic of OPPs and the main mechanism of impact of this class of pesticides onto a human body. The research demonstrates that HPLC-MS and GC-MS are the most perspective analytical methods of detection of OPPs in herbal substances.

© Фатеенкова О. В., Савватеев А. М., Белобородов В. Л., Гравель И. В., 2022
© Fateenkova O. V., Savvateev A. M., Beloborodov V. L., Gravel I. V., 2022

Conclusion. In the information-analytical review the authors specify a physical-chemical characteristics of OPPs, describe the mechanism of the toxic impact of this type of pesticides, provide the generalized summary of limits of permissible proportion of OPPs in herbal substances and in food production. The study shows that the rationing of OPPs proportion is harmonized in a majority of issues of modern pharmacopeias. The paper presents modern methods of detection of OPPs in herbal substances and food production. Finally, the authors demonstrate an advantage of the modern approach to rationing of OPPs in herbal substances (specification of presence and proportion of a single pesticide in combination with its toxic metabolites). The key issue is a necessity of developing a sensible and selective methodic of analysis of OPPs in accordance with physical-chemical properties of these types of pesticides in different kinds of herbal substances and phytopreparations.

Keywords: organophosphate pesticides, herbal substances, standardization, normative documents

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 V. Fateenkova has translated the foreign sources. Alexey M. Savvateev has developed and formed images and graphs. All authors participated in the collection and processing of scientific literature and normative documents data, writing the article and discussing the results.

For citation: Fateenkova O. V., Savvateev A. M., Beloborodov V. L., Gravel I. V. Rationing of residual organophosphate pesticides in herbal substances. *Drug development & registration*. 2022;11(3):137–151. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-137-151

ВВЕДЕНИЕ

С возникновением сельского хозяйства появилась необходимость применять средства для защиты растений. Синтетические пестициды начали широко использоваться с 1939 года, когда швейцарский химик Пауль Герман Мюллер открыл инсектицидные свойства дихлородифенилтрихлорометилметана (ДДТ). В настоящий момент времени пестициды широко применяются на всех этапах выращивания сельскохозяйственных культур: от возделывания до послеуборочного хранения. Они являются одним из наиболее важных инструментов защиты растений от сорняков, вредителей и болезней и способствуют повышению качества получаемого урожая, увеличению его количества [1, 2]. С 1960-х годов взамен персистентных хлорорганических пестицидов стали использовать фосфорорганические пестициды (ФОП). С тех пор они являются популярным и востребованным классом современных пестицидов [3, 4]. Высокая эффективность, доступная цена и разнообразный ассортимент обеспечили ФОП широкое применение в сельском хозяйстве [5–9].

Однако даже при соблюдении всех сельскохозяйственных и производственных практик пестициды могут оставаться в обрабатываемых растениях и оказывать влияние на окружающую среду в результате поступления в атмосферу, почву и водоемы [10–12]. Кроме того, некоторые ФОП обладают высокой персистентностью и способны оставаться в неизменном состоянии и сохранять свою токсичность в течение длительного времени [2, 13, 14]. Остаточные пестициды могут попадать и в организм человека [15–19]. Одним из источников токсичных ФОП может являться ЛРС, входящее в состав лекарственных препаратов и БАД.

Выявлено загрязнение как культивируемых, так и дикорастущих лекарственных растений различными видами пестицидов. Во всем мире проводятся различные скрининговые и мониторинговые исследования для определения наличия остаточных пестицидов в ЛРС, так как уровень безопасности препарата природного происхождения прямо зависит от его стандартизации [20]. В обширной публикации B. Klier и соав. [21] обобщены результаты анализа остаточных пестицидов в ЛРС и лекарственных растительных препаратах за период 2011–2016 гг. В 14,2 % из 16 782 проанализированных образцов 376 лекарственных трав обнаружен хлорпирифос-этил, в том числе и с превышающим допустимый уровень содержанием 12 мг/кг, что в 60 раз больше предела допустимого содержания в ЛРС (0,2 мг/кг), определенного ГФ РФ XIV [22]. В исследовании, проведенном в Египте [23], в 73 % образцов лекарственных растений были обнаружены остаточные пестициды, из которых 44 % проб содержали количества пестицидов, превышающие предел допустимого содержания. Наиболее часто в ЛРС присутствовал малатион – в 203 из 391 проб (52 %), за ним следует профенофос, обнаруженный в 131 из 391 проб (33 %). В исследовании пищевого сырья укропа, сельдерея, тмина, ромашки и шафрана обнаружены малатион и диметоат в концентрациях, превышающих предел допустимого содержания [24]. Хлорпирифос-этил был найден в образцах мелиссы, выращенных на северо-востоке Польши (урожай 2010 года) в концентрации на 0,21 мг/кг больше предела допустимого содержания (0,5 мг/кг) [25]. Хлорпирифос-этил найден китайскими учеными в каждом из 8 проанализированных образцов плодов боярышника в диапазоне концентраций 0,008–0,151 мг/кг [26]. Диметоат обнаружен в клубнях офиопогона японского в концентрации

0,1295 мг/кг (предел допустимого содержания – 0,1 мг/кг) [27]. Анализ 334 образцов 126 видов ЛРС, используемых в китайской традиционной медицине, показал, что наиболее часто в пробах присутствовал хлорпирифос (в 26 % проб), в то время как остаточные хлорорганические пестициды встречались в менее чем 2 % проб [28].

Информационно-аналитическое исследование допустимого содержания ФОП и аналитических методов, рекомендуемых для их определения в ЛРС и пищевой продукции растительного происхождения, являлось **целью данной работы**.

Физико-химическая характеристика фосфорорганических пестицидов

Нормируемые ГФ РФ XIV ФОП по типу фосфорной группы, являются эфирами, амидами, тиольными производными фосфорной или алкилфосфорной кислот (рисунок 1). В качестве группы Y выступают алифатические, ароматические и гетероциклические группы [29–31]. Алкоксильные группы сложноэфирной связи содержат алкильные или арильные заместители R^1 и R^2 (рисунок 2). Значительно отличается от представленных общих структур этион (рисунок 2, *XXVI*), являющийся производным дитиофосфорной кислоты.

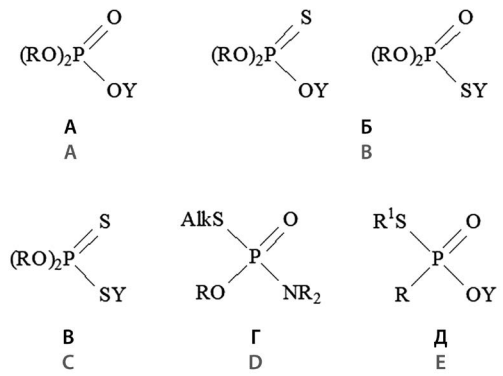


Рисунок 1. Типы фосфорной группы:

А – фосфаты; Б – фосфоротиоаты; В – фосфородитиоаты; Г – фосфорамидотиоаты; Д – фосфонодитиоаты

Figure 1. Types of phosphorus group:

A – phosphates; B – phosphorothioates; C – phosphorodithioates; D – phosphoramidothioates; E – phosphonodithioates

Физико-химические свойства ФОП зависят от структур заместителей R и Y. В основном ФОП представляют собой твердые кристаллические вещества либо бесцветные или желтовато-коричневые, часто маслянистые жидкости, имеющие специфический запах. ФОП являются слаболетучими соединениями [29, 32] с низкой термической лабильностью [33, 34]. ФОП малорастворимы в воде, растворимы в липидах и хлороформе [29]. Могут проявлять как кислотные, так и основные свойства за счет фрагментов в функциональных группах Y

Токсикологическая характеристика и метаболизм фосфорорганических пестицидов

ФОП являются необратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы (АХЭ) – они поражают холинергические синапсы центральной нервной системы и периферические нервно-мышечные синапсы и нарушают цепи синаптической передачи возбуждения [30, 35, 36]. В процессе ингибирования АХЭ атом фосфора связывается с аминокислотой на ферменте, при этом фрагмент X удаляется. Взаимодействие ФОП с активным центром АХЭ приводит к образованию ковалентной связи атома фосфора с гидроксильной группой серина, входящего в структуру эстеразного участка активного центра холинэстеразы (ХЭ). Происходит фосфорилирование фермента АХЭ, в результате чего ацетилхолин (АХ) накапливается на чувствительных к нему рецепторах [29, 30, 35, 37]. Токсическое действие ФОП обусловлено перевозбуждением холинорецепторов избытком АХ и отравление эндогенным АХ, накапливающимся в крови и тканях, вследствие прекращения его разрушения ферментом АХЭ.

ФОП различаются по своей биологической активности и эффективности в качестве ингибиторов АХЭ, например, фосфоратные соединения обладают большей внутренней стабильностью и в меньшей степени токсичны для млекопитающих, однако в тканях организма или в процессе окисления при неправильном хранении они способны превращаться в более токсичные оксоны (см. рисунок 2, II, VII, VIII, XXIV, XXV) [29, 36, 38]. ФОП, в которых атом фосфора связан с кислородом, обладают большей токсичностью и антихолинэстеразной активностью [9, 29, 38, 39].

Некоторые из ФОП, например малатион, диазинон, паратион, классифицируются Международным агентством по изучению рака (International Agency for Researchon Cancer) как, вероятно, канцерогенные для человека и относятся к группам 2A и 2B. Имеются данные о взаимосвязи ФОП с развитием неходжкинской лимфомы, рака простаты, лейкемией, раком легких [36, 37].

Метаболитами ФОП являются диалкилфосфаты диметиловых ФОП: диметилфосфат (ДМФ), диметилтиофосфат (ДМТФ) и диметилдитиофосфат (ДМДТФ), а также диэтилфосфаты – диэтилфосфат, диэтилтиофосфат и диэтилдитиофосфат [40]. Эти метаболиты часто используются в качестве биомаркеров воздействия пестицидов и свидетельствуют о попадании ФОП в организм человека. Например, 11 ФОП обнаружены в биологических жидкостях плазме крови и грудном молоке [16]. Исследование мочи 566 жителей девяти стран Евразии и Северной Америки показало, что в 92 % проб содержались специфические метаболиты таких ФОП, как малатион, азинфос-метил, хлорпирифос-метил, фентион: ДМФ, ДМТФ и ДМДТФ. На основании полученных результатов в исследовании приводится рассчитанное среднее суточное потребление

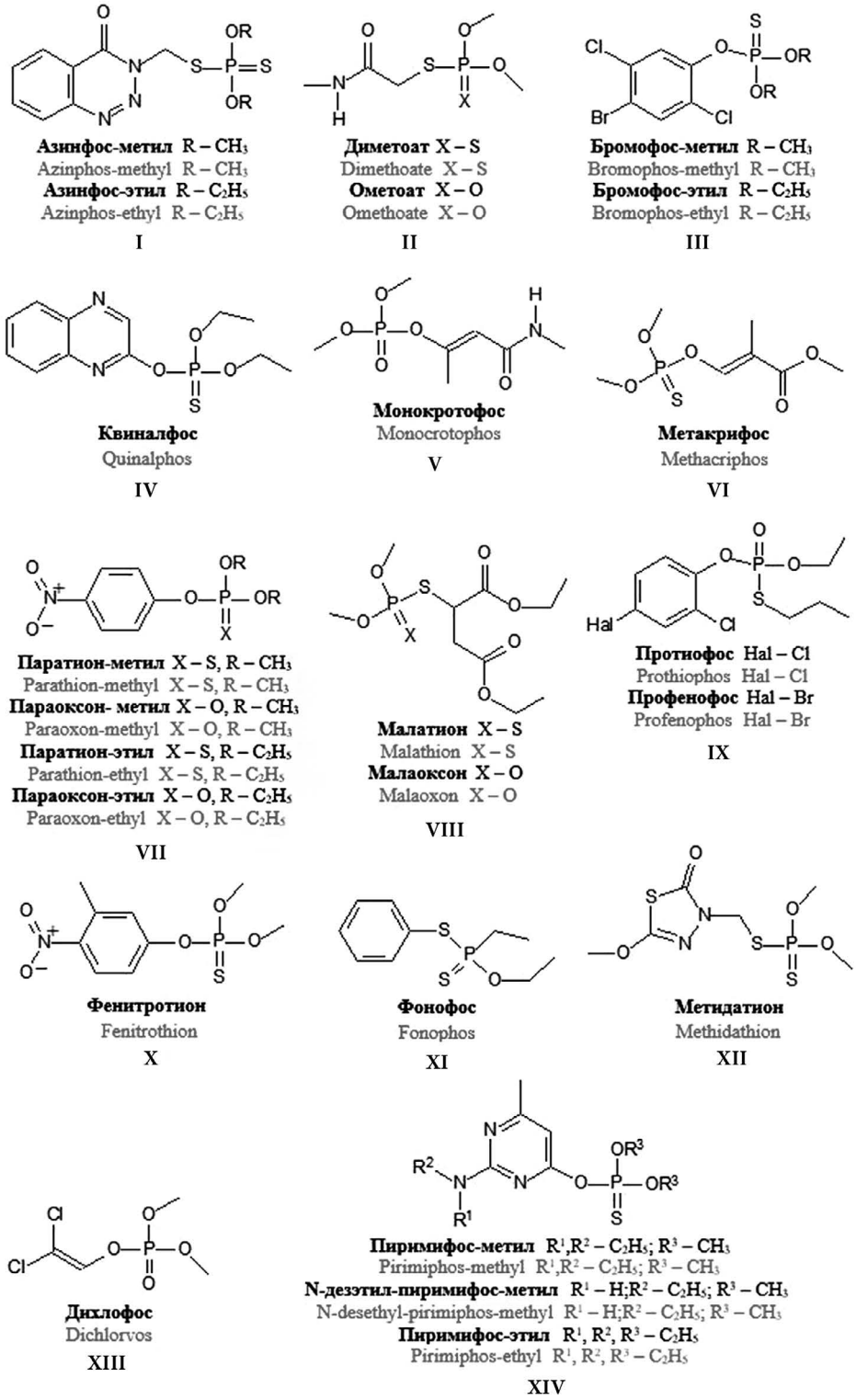
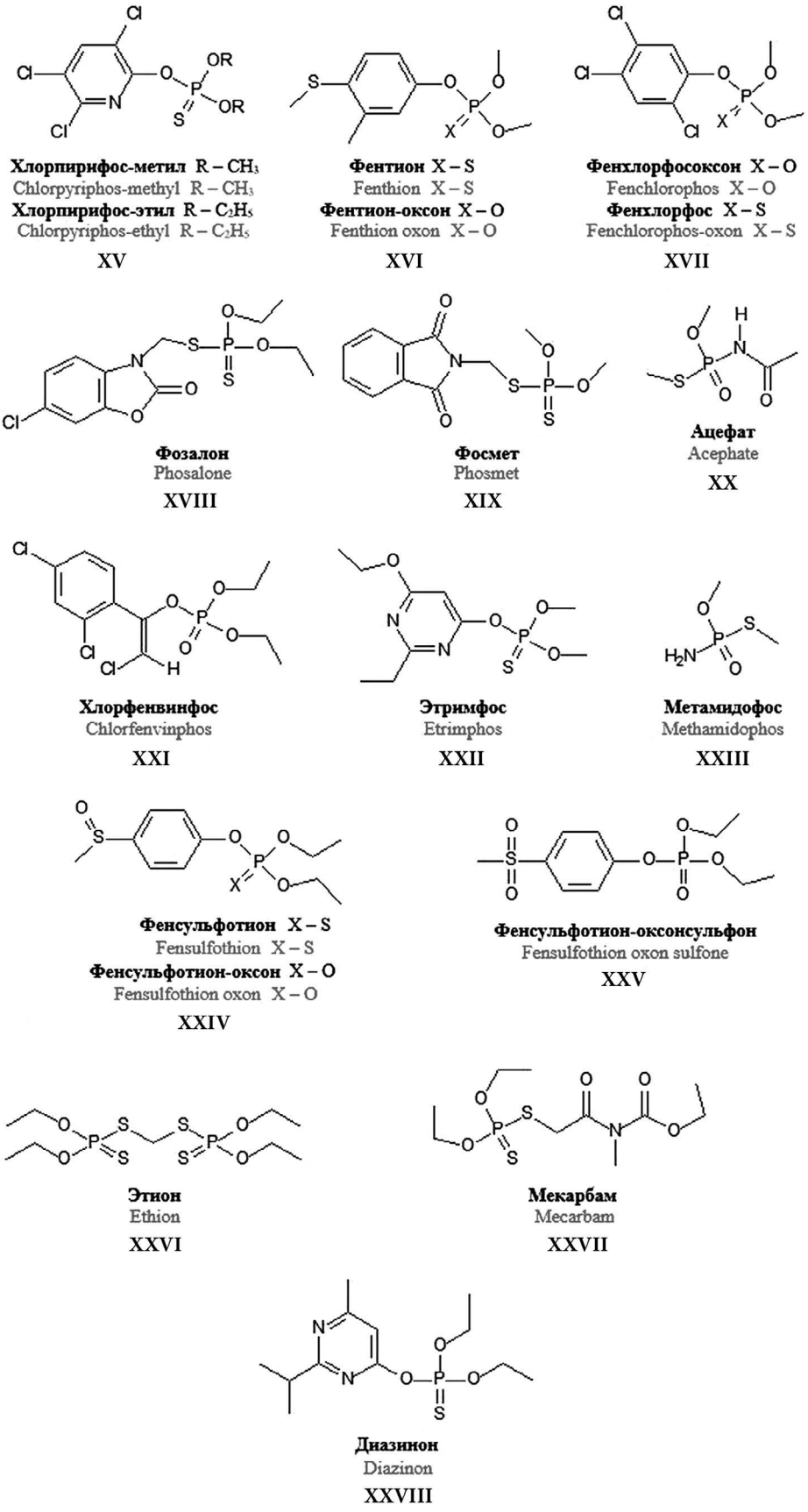


Рисунок 2. **Структурные формулы фосфорорганических пестицидов**

Figure 2. **Structure formulas of organophosphate pesticides**

ФОП – например, жители Китая за сутки потребляют суммарно 506 мкг малатиона и хлорпирифоса, причем 15 % проб мочи превышают допустимую суточную дозу потребления хлорпирифоса, установленную Агентством по охране окружающей среды США (18 мкг/день) [19]. Когортное исследование в Нидерландах показало, что в моче 784 беременных женщин обнаружены диметиловые и диэтиловые диалкилфосфаты в различной концентрации в зависимости от триместра [18].



Продолжение рисунка 2

Continuation of Figure 2

Пределы допустимого содержания фосфорорганических пестицидов

Наличие остаточных ФОП в ЛРС должно соответствовать современным представлением о безопасности ЛРС и регламентируется нормативной документацией разных стран в виде фармакопейных статей. Нормирование пределов допустимого содержания пестицидов в ЛРС основано на данных о надлежащей сельскохозяйственной практики (GAP) и было определено в согласовании с Codex Alimentarius – сводом пищевых международных стандартов, принятых Международной комиссией ФАО/ВОЗ [41] в соответствии с рекомендациями JMRR (Совместное совещание ФАО/ВОЗ по остаточным пестицидам), установленными для пищевых продуктов и кормов для животных [42]. Токсикологическая оценка остаточных пестицидов в ЛРС должна основываться на фактическом потреблении ЛРС пациентами. Как правило, возможное поступление в организм человека остаточных пестицидов из ЛРС должно составлять не более 1 % от общего поступления из всех источников, включая продукты питания и питьевую воду [43].

В таблице 1 систематизированы данные о пределах количественного содержания ФОП в ЛРС в действующих фармакопеях России (ГФ РФ XIV) [22], Европы (EP 10) [44], Британии (BP 2019 Vol. 1) [45], США (USP 42-NF 37) [46] и во второй части первого издания Vol. 3 фармакопеи Индии [47], а также сведения о пределах допустимого содержания ФОП в различных типах пищевой продукции согласно ГН 1.2.3539-18 «Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень)» [48], базе данных, регулирующейся Европейским парламентом [49] и своду пищевых международных стандартов Codex Alimentarius [50]. В таблицу не включены фармакопеи Китая Vol. 4 [51], Японии 17 [52] и Евразийского экономического союза [53] по следующим причинам:

- ✓ В фармакопее Японии [52] в частных статьях, посвященных отдельным видам ЛРС, нормируется содержание только хлорорганических пестицидов ДДТ и линдана – во всех видах ЛРС допускается не более 0,2 ppm каждого из пестицидов.
- ✓ В фармакопее Китая [51] приведены пределы допустимого содержания только для хлорорганических соединений.
- ✓ Фармакопея Евразийского экономического союза [53] в данный момент времени находится в стадии выпуска, издан только первый том, в котором нет статьи, посвященной остаточным пестицидам в ЛРС.

В Британской фармакопее [45] статья, посвященная остаточным пестицидам, полностью гармонизирована с Европейской фармакопеей [54].

Пределы допустимого содержания всех 33 ФОП в ЛРС гармонизированы между собой в фармакопеях ГФ РФ XIV [22], EP 10 [44] и USP 42-NF 37 [46]. Во второй части первого издания Vol. 3 фармакопеи Индии «The Unani Pharmacopoeia of India» [47] не нормируется содержание целого ряда пестицидов: только 15 ФОП из 33, нормируемых в ведущих фармакопеях, приведены в статье «2.5 Pesticide Residue», посвященной остаточным пестицидам, пределы их допустимого содержания в ЛРС гармонизированы с ведущими фармакопеями.

Различаются подходы к нормированию некоторых ФОП. Например, в ГФ РФ XIV фенсульфотион нормируется в сумме [можно предположить, что с фенсульфотион-оксоном и фенсульфотион-оксонсульфоном (рисунок 2, XXIV и XXV), так как конкретные соединения не указаны]. В фармакопеях Европы EP 10 и США USP 42-NF 37 обозначены производные фенсульфотиона: фенсульфотион-оксон, фенсульфотион-оксонсульфон и фенсульфотион-сульфон.

Пределы допустимого содержания ФОП в различных типах пищевой продукции существенно различаются в сравнении с фармакопеями ГФ РФ XIV, EP 10, USP 42-NF 37 и Индии. Так, например, разрешенное содержание дихлофоса в ЛРС – 1 мг/кг [22, 44–47], а в пищевой продукции этот диапазон варьируется от 0,05 до 10 мг/кг и различается между собой в 200 раз [48–50].

В гигиеническом нормативе ГН 1.2.3539-18 «Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень)» не нормируются такие ФОП, как бромофос-метил, квиналфос, мекарбам, метакрифос, монокротофос, паратион-метил и параоксон-метил (в сумме), фенсульфотион, фенхлорфос (сумма фенхлорфоса и фенхлорфосоксона), фозалон, хлорфенвинфос и этион (структурные формулы представлены на рисунке 2) [48]. Пределы допустимого содержания регламентируются только для диметоата, малатиона и пиримифос-метила без суммы с токсичными метаболитами (таблица 1, рисунок 2, II, VIII и XIV соответственно).

Пределы допустимого содержания остаточных пестицидов в пищевой продукции гармонизированы между всеми странами ЕС и регламентируются постановлениями Европейского парламента. Существует европейская база допустимого содержания пестицидов в различных видах сельскохозяйственной продукции [49]. Если пестицид в базе отсутствует, то его количество считается допустимым до 0,01 мг/кг. Содержание ФОП нормируется в семенах тмина и корнях валерианы, используемых также и в фармацевтической промышленности. Пределы допустимого содержания совпадают с фармакопейными всего лишь для пяти ФОП у семян тмина и для шести у корней валерианы (таблица 1). Для остальных пестицидов имеются значимые различия, например в тмине пищевом допускается в 20 раз большее содержание фозалона, чем в ЛРС (таблица 1).

В Codex Alimentarius [50] в различных видах пищевой продукции нормируется 18 ФОП из 33, приведенных в ведущих фармакопеях. Подходы к нормированию ФОП отличаются от утвержденных в фармакопеях ГФ РФ XIV, EP 10, USP 42-NF 37 и регламентах Европейского парламента: Codex Alimentarius регламентирует содержание только малатиона без суммы с малаоксоном.

Таблица 1. Пределы допустимого содержания остаточных ФОП в лекарственном и пищевом сырье

Table 1. Maximum residue limits of pesticides in herbal and food substances

Название пестицида* Pesticide name*	**Регламентированное содержание в фармакопеях** Regulated limits in pharmacopoeias		**Регламентированное содержание в пищевом сырье (мг/кг)** Regulated limits in food substances (mg/kg)
	норма (мг/кг) limit (mg/kg)	**ссылки** references	
Азинфос-метил Azinphos-methyl I	1,0	[22, 44–47]	0,1 – корни валерианы [49]; 0,5 – семена тмина [49], специи [50]; 2,0 – плодовые семечковые [48] 0.1 – valerian roots [49]; 0.5 – caraway seeds [49], spices [50]; 2.0 – pome fruits [48]
Азинфос-этил Azinphos-ethyl I	0,1	[22, 44–46]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49]; 2,0 – кочанная капуста [48] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]; 2.0 – cabbage [48]
Ацефат Acephate XX	0,1	[22, 44–46]	0,05 – корни валерианы [49]; 0,1 – плодовые семечковые [48]; 0,2 – семена тмина [49], специи [50] 0.05 – valerian roots [49]; 0.1 – pome fruits [48]; 0.2 – caraway seeds [49]; spices [50]
Бромофос-метил Bromophos-methyl III	0,05	[22, 44–46]	
Бромофос-этил Bromophos-ethyl III	0,05	[22, 44–46]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,1 – плодовые семечковые [48] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.1 – pome fruits [48]
Диазинон Diazinon XXVIII	0,5	[22, 44–47]	0,05 – корни валерианы [49]; 0,1 – плодовые семечковые [48], семена тмина [49], специи, фрукты и ягоды [50] 0.05 – valerian roots [49]; 0.1 – pome fruits [48], caraway seeds [49], spices, fruits and berries [50]
Дихлофос Dichlorvos XIII	1,0	[22, 44–47]	0,05 – плодовые семечковые, косточковые [48]; 0,02 – корни валерианы [49]; 0,1 – семена тмина [49], специи [50] 0.05 – pome fruits, stone fruits [48]; 0.02 – valerian roots [49]; 0.1 – caraway seeds [49], spices [50]
Диметоат и ометоат (в сумме) Dimethoate and omethoate (sum of) II	0,1	[22, 44–46]	0,05 (только ометоат) – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,02 (только диметоат) – плодовые семечковые [48]; 0,5 (только диметоат) – семена тмина, корни валерианы [49], специи, фрукты и ягоды [50] 0.05 (only omethoate) – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.02 (only dimethoate) –pome fruits [48]; 0.5 (only dimethoate) – caraway seeds, valerian roots [49], spices, fruits and berries [50]
Квиналфос Quinalphos IV	0,05	[22, 44–46]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]
Малатион (в сумме с малаоксоном) Sum of malathion and malaoxon VIII	1,0	[22, 44–46]	0,02 – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,5 (только малатион) – плодовые семечковые [48]; 1,0 (только малатион) – специи, фрукты и ягоды [50] 0.02 – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.5 (only malathion) – pome fruits [48]; 1.0 (only malathion) – spices, fruits and berries [50]
	1,0 (только малатион) (only malathion)	[47]	
Мекарбам Mecarbam XXVII	0,05	[22, 44–46]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]
Метакрифос Methacriphos VI	0,05	[22, 44–46]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]

Продолжение таблицы 1

Название пестицида* **Pesticide name***	**Регламентированное содержание в фармакопеях** **Regulated limits in pharmacopoeias**		**Регламентированное содержание в пищевом сырье (мг/кг)** **Regulated limits in food substances (mg/kg)**
	норма (мг/кг) **limit (mg/kg)**	**ссылки** **references**	
Метамидофос Methamidophos XXIII	0,05	[22, 44–46]	0,05 – корни валерианы [49]; 0,02 – сахарная свекла [48]; 0,1 – семена тмина [49], специи [50] 0.05 – valerian roots [49]; 0.02 – sugar beet [48]; 0.1 – caraway seeds [49], spices [50]
Метидатион Methidathion XII	0,2	[22, 44–47]	0,1 – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,5 – чай [50]; 1,0 – плодовые семечковые [48] 0.1 – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.5 – tea [50]; 1.0 – pome fruits [48]
Монокротофос Monocrotophos V	0,1	[22, 44–46]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]
Паратион-метил и параоксон-метил (в сумме) Parathion-methyl and paraoxon-methyl (sum of) VII	0,2	[22, 44–46]	0,05 – корни валерианы [49]; 5,0 – семена тмина [49]; 5,0 (только паратион-метил) – фрукты и ягоды, специи [50] 0.05 – valerian roots [49]; 5.0 – caraway seeds [49]; 5.0 (only parathion-methyl) – fruits and berries, spices [50]
	0,2 (только паратион-метил) (only parathion-methyl)	[47]	
Паратион-этил и параоксон-этил (в сумме) Parathion-ethyl and paraoxon-ethyl (sum of) VII	0,5	[22, 44–46]	0,2 – плодовые семечковые [48]; 0,1 (только паратион-этил) – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,2 (только паратион-этил) – специи, фрукты и ягоды [50] 0.2 – pome fruits [48]; 0.1 (only parathion-ethyl) – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.2 (only parathion-ethyl) – spices, fruits and berries [50]
	0,5 (только паратион-этил) (only parathion-ethyl)	[47]	
Пиримифос-метил с N-дезэтил-пиримифос-метил (в сумме) Pirimiphos-methyl and N-desethyl-pirimiphos-methyl (sum of) XIV	4,0	[22, 44–46]	0,05 (только пиримифос-метил) – корни валерианы [49]; 0,5 (только пиримифос-метил) – плодовые (косточковые), виноград, чай [48], семена тмина [49], специи, фрукты и ягоды [50] 0.05 (only pirimiphos-methyl) – valerian roots [49]; 0.5 (only pirimiphos-methyl) – stone fruits, grapes, tea [48], caraway seeds [49], spices, fruits and berries [50]
	4,0 (только пиримифос-метил) (only pirimiphos-methyl)	[47]	
Пиримифос-этил Pirimiphos-ethyl XIV	0,05	[22, 44–46]	0,1 – кукуруза (зерно) [48] 0.1 – corn (kernel) [48]
Протиофос Prothiophos IX	0,05	[22, 44–46]	0,1 – хлопчатник (масло), виноград [48] 0.1 – cotton (oil), grapes [48]
Профенофос Profenophos IX	0,1	[22, 44–46]	0,05 – корни валерианы [49]; 0,07 – семена тмина [49]; 0,5 – чаи (включая травяной чай) [48] 0.05 – valerian roots [49]; 0.07 – caraway seeds [49]; 0.5 – teas (including herbal tea) [48]
Фенитротион Fenitrothion X	0,5	[22, 44–47]	0,05 – корни валерианы [49]; 0,5 – плодовые семечковые [48]; 1,0 – семена тмина [49], специи, фрукты и ягоды [50] 0.05 – valerian roots [49]; 0.5 – pome fruits [48]; 1.0 – caraway seeds [49], spices, fruits and berries [50]

Продолжение таблицы 1

Название пестицида* Pesticide name*	**Регламентированное содержание в фармакопеях** Regulated limits in pharmacopoeias		**Регламентированное содержание в пищевом сырье (мг/кг)** Regulated limits in food substances (mg/kg)
	норма (мг/кг) limit (mg/kg)	**ссылки** references	
Фенсульфотион (в сумме) Fensulfothion (sum of) XXIV, XXV	0,05	[22]	
	0,05 (сумма фенсульфотиона, фенсульфотион-оксона, фенсульфотион-оксон-сульфона и фенсульфотион-сульфона) (sum of fensulfothion, fensulfothion oxon, fensulfothion oxon sulfone and fensulfothion sulfone)	[44–46]	
Фентион (в сумме) Fenthion (sum of) XVI	0,05	[22]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,05 (только фентион) – рис [50]; 0,15 – зерно хлебных, злаковых, зернобобовые, свекла сахарная [48] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.05 (only fenthion) – rice [50]; 0.15 – grains, cereals, legumes, sugar beets [48]
	0,05 (сумма фентиона, фентион-оксона, фентион-оксон-сульфона, фентион-оксон-сульфоксида, фентион-сульфона и фентион-сульфоксида) (sum of fenthion, fenthion oxon, fenthion oxon sulfone, fenthion oxon sulfoxide, fenthion sulfone and fenthion sulfoxide)	[44–46]	
Фенхлорфос (сумма фенхлорфоса и фенхлорфосоксона) Fenchlorophos (sum of fenchlorophos and fenchlorophosoxon) XXVII	0,1	[22, 44–46]	0,1 – семена тмина, корни валерианы [49] 0.1 – caraway seeds, valerian roots [49]
Фонофос Fonophos XI	0,05	[22, 44–47]	
Фозалон Phosalone XVIII	0,1	[22, 44–47]	0,05 – корни валерианы [49]; 2,0 – семена тмина [49], специи, фрукты и ягоды [50] 0.05 – valerian roots [49]; 2.0 – caraway seeds [49], spices, fruits and berries [50]
Фосмет Phosmet XIX	0,05	[22, 44–46]	0,1 (сумма фосмета и фосмет-оксона) – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,25 – sugar beet [48]; 10,0 – голубика, виноград, абрикос, нектарин, персик, плодовые семечковые [48], абрикосы [50] 0.1 (sum of phosmet and phosmet-oxon) – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.25 – sugar beet [48]; 10.0 – blueberries, grapes, apricot, nectarine, peach, pome fruits [48], apricots [50];
Хлорпирифос-метил Chlorpyriphos-methyl XV	0,1	[22, 44–47]	0,01 – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,3 – специи, фрукты и ягоды [50]; 1,0 – баклажаны, виноград, перец, плодовые семечковые, томаты [48] 0.01 – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.3 – spices, fruits and berries [50]; 1.0 – eggplants, grapes, peppers, pome fruits, tomatoes [48]
Хлорпирифос-этил Chlorpyriphos-ethyl XV	0,2	[22, 44–47]	0,01 – семена тмина, корни валерианы [49]; 0,5 – плодовые семечковые, виноград [48]; 1,0 – специи, фрукты и ягоды [50] 0.01 – caraway seeds, valerian roots [49]; 0.5 – pome fruits, grapes [48]; 1.0 – spices, fruits and berries [50]

Окончание таблицы 1

Название пестицида* Pesticide name*	**Регламентированное содержание в фармакопеях** Regulated limits in pharmacopoeias		**Регламентированное содержание в пищевом сырье (мг/кг)** Regulated limits in food substances (mg/kg)
	норма (мг/кг) limit (mg/kg)	**ссылки** references	
Хлорфенвинфос Chlorfenvinphos XXI	0,5	[22, 44–47]	0,05 – семена тмина, корни валерианы [49] 0.05 – caraway seeds, valerian roots [49]
Этион Ethion XXVI	2,0	[22, 44–47]	0,05 – корни валерианы [49]; 5,0 – семена тмина [49], специи, фрукты и ягоды [50] 0.05 – valerian roots [49]; 5.0 – caraway seeds [49], spices, fruits and berries [50]
Этримфос Etrimphos XXVII	0,05	[22, 44–46]	0,5 – хлопчатник (масло), плодовые семечковые и косточковые, виноград [48] 0.5 – cotton (oil), pome and stone fruits, grapes [48]

Примечание. * Латинскими цифрами обозначен номер формулы на рисунке 2.

Note. * Latin numerals indicate the number of the formula in Figure 2.

В настоящий момент фармакопейные требования содержания ФОП в ЛРС и ЛРП существенно отличаются от норм для пищевых продуктов. Различаются подходы к нормированию ФОП – в ОФС фармакопей ГФ РФ XIV, EP 10 и USP 42-NF 37. Ряд пестицидов нормируется в сумме с метаболитами и производными. В пищевой продукции конкретные пестициды нормируются индивидуально без учета образующихся метаболитов.

Изолирование остаточных фосфорорганических пестицидов из растительного сырья

Подготовка проб является времязатратным и трудоемким этапом аналитических методик. Одним из наиболее распространенных рекомендованных в нормативной документации способов подготовки проб является метод твердо-жидкостной экстракции [47, 55–58]. Различия в пробоподготовке проявляются в способе изолирования аналитов, например, толуолом или ацетоном с последующим концентрированием [47, 57, 58] или с последующим применением жидкостно-жидкостной экстракции [55], адсорбционной колоночной хроматографии [43, 51, 56] и гель-фильтрующей хроматографии [55].

Вследствие разнообразия структур ФОП и их метаболитов очевидно, что стандартные методы определения остаточных пестицидов не универсальны, так как в ходе процедур экстракции и очистки некоторые из них слабо либо совсем не извлекаются [25]. После хроматографического разделения пестициды могут разлагаться или претерпевать биотрансформацию [59].

В настоящее время наиболее широко используемым способом подготовки образцов при анализе ФОП в ЛРС является разработанная в 2003 году для пищевых продуктов система пробоподготовки QuEChERS [51, 60–62].

В современной литературе отражены такие способы пробоподготовки высушенных растений и специй для анализа, как твердофазная экстракция [63, 64], гель-проникающая хроматография [65], матричное твердофазное диспергирование [25], жидкостная экстракция под давлением [66], сорбционная экстракция [67], твердофазная микроэкстракция [68] и дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция [69].

Большой интерес представляет использование методов непосредственного определения следовых количеств ФОП в матрицах без трудоемких операций извлечения. Такие подходы основаны на последних достижениях в повышении специфичности масс-спектрометрического оборудования (ГХ-МС-МС и ВЭЖХ-МС-МС).

Аналитические методы определения фосфорорганических пестицидов в растительном сырье

Среди методов определения ФОП в ЛРС наиболее широко применяется газовая хроматография в сочетании с пламенно-ионизационным, азотно-фосфорным или атомно-эмиссионным детекторами с расчетом концентрации методом внутреннего стандарта (для определения ФОП используется карбофенотион) [43, 47, 57, 58].

В фармакопее Китая помимо метода газовой хроматографии для определения ФОП предлагаются более современные и дорогостоящие методы анализа: ГХ-МС-МС и ВЭЖХ-МС-МС. Для 19 ФОП из 33 нормируемых в фармакопеях РФ, Европы и США приведены такие параметры одновременного хроматографического определения, как время удерживания конкретного пестицида, MRM-переходы для детектирования и подтверждения присутствия, энергия фрагментации и пределы обнаружения [51].

В фармакопеях ГФ РФ XIV и Японии [52] регламентирован метод для определения только хлорорганических пестицидов.

Обращает на себя внимание факт того, что в настоящее время действующие фармакопеи EP 10 и USP 42 NF-37 отошли от регламентирования унифицированных методик определения ФОП в ЛРС. Такой подход вполне понятен с учетом постоянного совершенствования аналитического оборудования и повышения селективности и чувствительности анализа, но требует более квалифицированного персонала. В данный момент в EP 10 предлагается использовать любой метод определения остаточных пестицидов в ЛРС, удовлетворяющий критериям, приведенным в ОФС 2.8.13 «Pesticide residues», а также валидированный в соответствии с SANCO/10232/2006 «Quality control procedures for pesticide residues analysis» [70]. В USP 42-NF 37 рекомендовано применять методы, удовлетворяющие критериям SANTE/11813/2017 «Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed» [71] и в соответствии с принципами валидации OPPTS 860.1490 «Рекомендации по химическому тестированию остатков» [72].

В ГОСТ 30710-2001 [56] для определения ФОП в овощах, фруктах и продуктах, их переработки используют методы ТСХ ГХ в сочетании с термоионным детектором.

В мировой практике, кроме использования ГХ в сочетании с различными методами детектирования для определения ФОП, внедряются методики с использованием ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС [73–76]. Предпочтение метода ВЭЖХ обусловлен физико-химическими свойствами ФОП (относительно низкой летучестью и низкой термической лабильностью соединений) и разнообразием способов детектирования. Кроме того, ВЭЖХ является одним из самых чувствительных и высокоселективных методов определения органических загрязнителей. В руководящих документах SANCO/10232/2006 [70] и SANTE/11813/2017 [71] в равной степени допускается использование как ГХ-МС и ГХ-МС-МС, так и ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС.

Использование селективных и высокочувствительных методов анализа для определения низких концентраций остаточных ФОП в ЛРС методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС позволяет проводить одновременное детектирование широкого спектра ФОП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительного анализа нормирования ФОП в ЛРС и пищевой продукции в ГФ РФ XIV, международных фармакопеях, материалах ВОЗ и нормативной документации, посвященной пищевой продукции, установлено, что в ГФ РФ XIV, EP 10, BP 2019 Vol. 1 и USP 42-NF 37 нормируется 33 ФОП, в 1 изд. 2-й части Фармакопеи Индии – 15 ФОП, а в фармакопеях Китая и Японии нормы для ФОП в ЛРС отсутствуют.

Представлена обобщенная сводка пределов допустимого содержания ФОП в ЛРС и ряде пищевых источников. Данные значения в перечисленных фармакопейных изданиях в большинстве гармонизированы между собой, но различаются от пищевой продукции. Пределы допустимого содержания для пищевой продукции основаны на возможности индивидуального поступления с конкретным видом продукции с учетом среднесуточного потребления. Отмечено, что нормирование содержания ФОП в ЛРС во многих случаях включает не только непосредственно пестицид, но и его токсичные метаболиты, тогда как в нормативной документации, на пищевую продукцию, в основном регламентируются только сами пестициды.

В ГФ РФ XIV не в полной мере раскрыто нормирование таких пестицидов, как фентион и фенсульфотион. Токсичность и устойчивость метаболитов ФОП изучены недостаточно. Для обеспечения безопасности применения ЛРП нормативные документы, посвященные определению остаточных пестицидов, требуют доработки как в отношении конкретизации суммарного содержания индивидуальных пестицидов и их метаболитов, так и в отношении совершенствования методик анализа.

Стандартизованные методы определения ФОП в ЛРС описаны на данный момент только в Индийской и Китайской фармакопеях. В EP 10, USP 42-NF 37 и BP 2019 Vol. 1 рекомендовано использовать любую валидированную методику, соответствующую критериям приемлемости с точки зрения селективности и чувствительности анализа. Наиболее перспективным аналитическими методами определения ФОП в ЛРС являются ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС в сочетании с системой подготовки проб QuEChERS, которые позволяют извлечь труднолетучие, с низкой термической лабильностью ФОП из различных видов ЛРС и проводить одновременный анализ значительно отличающихся по структуре ФОП и их метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. European Commission E. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*. 2009;309:1–50.
2. Tripathy V., Basak B. B., Varghese T. S., Saha A. Residues and contaminants in medicinal herbs–A review. *Phytochemistry Letters*. 2015;14:67–78. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.09.003.
3. McKelvey W., Jacobson J. B., Kass D., Barr D. B., Davis M., Calafat A. M., Aldous K. M. Population-based biomonitoring of exposure to organophosphate and pyrethroid pesticides in New York City. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(11–12):1349–1356. DOI: 10.1289/ehp.1206015.
4. Atwood D., Paisley-Jones C. Pesticides Industry Sales and Usage 2008–2012 Market Estimates. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2017. 24 p.
5. Li H.-Z., Zeng E. Y., You J. Mitigating pesticide pollution in China requires law enforcement, farmer training, and technological in-

novation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2014;33(5):963–971. DOI: 10.1002/etc.2549.
6. NZIER report to the Environmental Protection Authority. Organophosphate and carbamate reassessment; 2015. 26 p. Available at: https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsno-ar/APP202098/285cfa8da9/APP202098-NZIER-CCD-report.pdf Accessed: 20.12.2021.
7. Singh P., Prasad S. M. Antioxidant enzyme responses to the oxidative stress due to chlorpyrifos, dimethoate and dieldrin stress in palak (Spinacia oleracea L.) and their toxicity alleviation by soil amendments in tropical croplands. *Science of the Total Environment*. 2018;630:839–848. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.203.
8. Yadav I. C., Devi N. L., Zhong G., Li J., Zhang G., Covaci A. Occurrence and fate of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in indoor air and dust of Nepal: Implication for human exposure. *Environmental Pollution*. 2017;229:668–678. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.0895.
9. Eto M. Organophosphorus pesticides: Organic and Biological Chemistry. Boca Raton: CRC Press; 2018. 369 p.
10. Schummer C., Mothiron E., Appenzeller B. M. R., Rizet A., Wennig R., Millet M. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. *Environmental Pollution*. 2010;158(2):576–584. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.08.019.
11. Rajput S., Kumari A., Arora S., Kaur R. Multi-residue pesticides analysis in water samples using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *MethodsX*. 2018;5:744–751. DOI: 10.1016/j.mex.2018.07.005.
12. Mwevura H., Kylin H., Vogt T., Bouwman H. Dynamics of organochlorine and organophosphate pesticide residues in soil, water, and sediment from the Rufiji River Delta, Tanzania. *Regional Studies in Marine Science*. 2021;41:101607. DOI: 10.1016/j.rsma.2020.101607.
13. Ганиев М. М., Недорезков В. Д. Химические средства защиты растений. М.: КолосС; 2006. 400 с.
14. Noore S., Ramesh G., Vendan S. E., Nagaraju V. D. Persistence and diffusion behaviour of chlorpyrifos in five different species of vegetables: A comparative analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;217:112208. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112208.
15. Romero-González R., Aguilera-Luiz M. M., Plaza-Bolaños P., Frenich A. G., Vidal J. M. Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: Application for the determination of veterinary drugs in milk. *Journal of chromatography A*. 2011;1218(52):9353–9565. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.074.
16. Naksen W., Prapamontol T., Mangklabruks A., Chantara S., Thavornyutikarn P., Robson M. G., Ryan P. B., Barr D. B., Panuwet P. A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in human plasma and breastmilk using GC-FPD. *Journal of Chromatography B*. 2016;1025:92-104. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.04.045.
17. Kim K.-H., Kabir E., Jahan S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*. 2017;575:525–535. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.
18. van den Dries M. A., Pronk A., Guxens M., Spaan S., Voortman T., Jaddoe V. W., Jusko T. A., Longnecker M. P., Tiemeier H. Determinants of organophosphate pesticide exposure in pregnant women: A population-based cohort study in the Netherlands. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2018;221(3):489–501. DOI: 10.1016/j.ijheh.2018.01.013.
19. Li A. J., Kannan K. Profiles of urinary neonicotinoids and dialkylphosphates in populations in nine countries. *Environment International*. 2020;145:106120. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106120.
20. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2-е изд. М.: Медицина; 2005. 832 с.
21. Klier B., Häfner E., Albert H., Binder G., Knödler M., Kühn M., Schenk A., Steinhoff B. Pesticide residues in herbal drugs: Evaluation of a database. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2019;15:100223. DOI: 10.1016/j.jarmap.2019.100223.
22. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Т. 2. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. Доступно по: https://femb.ru/femb/pharmacopea.php/ Ссылка активна на 20.12.2021.
23. Dogheim S. M., Ashraf A., El M. M. S., Alla A. G., Khorshid M. A., Fahmy S. M. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. *Food Additives and Contaminants*. 2004;21(4):323–330. DOI: 10.1080/02652030310001656361.
24. Abou-Arab A. A. K., Abou Donia M. A. Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. *Food Chemistry*. 2001;72(4):439–445. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00254-5.
25. Łozowicka B., Jankowska M., Rutkowska E., Hrynko I., Kaczyński P., Miciński J. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography. *Journal of Nature and Science of Medicine*. 2014;68(1):95–111. DOI: 10.1007/s11418-013-0777-9.
26. Fu Y., Dou X., Zhang L., Qin J., Yang M., Luo J. A comprehensive analysis of 201 pesticides for different herbal species-ready application using gas chromatography-tandem mass spectrometry coupled with QuEChERs. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2019;1125:121730. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121730.
27. Hu Y., Wan L., Zhang J., Yang F., Cao J. Rapid determination of pesticide residues in Chinese materia medica using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012;2(3): 286–293. DOI: 10.1016/j.apsb.2012.03.005.
28. Harris E. S., Cao S., Littlefield B. A., et al. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines. *Science of the Total Environment*. 2011;409(20):4297–4305. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.032.
29. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva: World Health Organization; 1986. 135 p.
30. Roberts J. R., Reigart J. R. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 6th ed. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs; 2013. 272 p.
31. Kumar V., Upadhay N., Wasit A. B., Singh S., Kaur P. Spectroscopic methods for the detection of organophosphate pesticides–A preview. *Current World Environment*. 2013;8(2):313–318. DOI: 10.12944/CWE.8.2.19.
32. Plumlee K. Clinical Veterinary Toxicology. St Louis, MO: Mosby; 2004. 477 p. DOI: 10.1016/B0-32-301125-X/50024-8.
33. Holden A. J., Chen L., Shaw I. C. Thermal stability of organophosphorus pesticide triazophos and its relevance in the assessment of risk to the consumer of triazophos residues in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(1):103–106. DOI: 10.1021/jf0002589.
34. Guo G., Jiang N., Liu F., Bian Y. Storage stability of organophosphorus pesticide residues in peanut and soya bean extracted solutions. *Royal Society Open Science*. 2018;5(7):180757. DOI: 10.1098/rsos.180757.
35. Аляутдин Р. Н. Фармакология. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2004. 592 с.
36. Some organophosphate insecticides and herbicides. Lyon: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2015. 452 p.
37. Vinson F., Merhi M., Baldi I., Raynal H., Gamet-Payrastre L. Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies. *Occupational and Environmental Medicine*. 2011;68(9):694–702. DOI: 10.1136/oemed-2011-100082.
38. Varfolomeev S. D., Efremenko E. N. Organophosphorus neurotoxins. 1st ed. Moscow: RIOR; 2020. 380 p. DOI: 10.29039/02026-5.
39. Saxena G., Bharagava R. M. Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume I: Industrial Waste and Its Management. Singapore: Springer Nature; 2020. 436 p. DOI: 10.1007/978-981-13-1891-7_13.
40. Katsikantami I., Kavvalakis M. P., Tzatzarakis M. N., Nosyrev A. E., Vakonaki E., Tsatsakis A. M. Advances on Biomonitoring of Organophosphorus and Organochlorine Pesticides. *Journal of Siberian Federal University*. 2017;10(2):153–170. DOI: 10.17516/1997-1389-0019.
41. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual, 21st ed. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme; 2013, 205 p. Available at: https://www.fao.org/3/a1472e/a1472e00.htm/ Accessed: 20.12.2021.
42. Quality control methods for herbal materials. Geneva: World Health Organization; 2011. 173 p. Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/44479/ Accessed: 20.12.2021.
43. WHO Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva: World Health

Organization; 2007. 105 p. Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/43510/ Accessed: 20.12.2021.
44. European Pharmacopoeia 10th edition. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). Available at: https://pheur.edqm.eu/ Accessed: 20.12.2021.
45. The British Pharmacopoeia 2019. Volume I. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. British Pharmacopoeia Commission. Available at: https://www.pharmacopoeia.com/ Accessed: 20.12.2021.
46. United States Pharmacopeia 42. National Formulary 37, Second Supplement. United States Pharmacopeial Convention. Available at: http://www.uspnf.com/ Accessed: 20.12.2021.
47. The Unani Pharmacopoeia of India. 1st Edition, Part 2, Vol. 3. Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy Ministry of AYUSH, Government of India. Available at: https://main.ayush.gov.in/ Accessed: 20.12.2021.
48. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень): Гигиенические нормативы ГН 1.2.3539-18. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2019. 156 с.
49. EU Pesticide Database. European Commission. Available at: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en/ Accessed: 20.12.2021.
50. Codex Alimentarius. Codex Pesticides Residues in Food Online Database. Available at: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/ Accessed: 20.12.2021.
51. Pharmacopoeia of The People's Republic of China. Vol. 4. Chinese Pharmacopoeia Commission. China Medical Science Press. Available at: http://fuwu.chp.org.cn/ Accessed: 20.12.2021.
52. Japanese Pharmacopoeia. 17th Edition. English Version. The Minister of Health. Labour and Welfare. 2016. Available at: https://www.pmda.go.jp/ Accessed: 20.12.2021.
53. Фармакопея Евразийского экономического союза. Москва: Евразийская экономическая комиссия; 2020. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/ Ссылка активна на 20.12.2021.
54. Index of World Pharmacopoeias and Pharmacopeial Authorities. Geneva: World Health Organization; 2021. 51 p. Available at: https://www.who.int/publications/m/item/QAS-11.453-Rev.12/ Accessed: 20.12.2021.
55. Мультиметоды для газохроматографического определения остатков пестицидов: Межгосударственный стандарт ГОСТ 32689.2-2014. Москва: Стандартинформ; 2015. 29 с.
56. Плоды, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов: Межгосударственный стандарт ГОСТ 30710-2001. Москва: ИПК Издательство стандартов; 2001. 15 с.
57. European Pharmacopoeia 5th ed. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). Available at: https://pheur.edqm.eu/ Accessed: 20.12.2021.
58. United States Pharmacopeia 38. National Formulary 33, First Supplement. United States Pharmacopeial Convention. Available at: http://www.uspnf.com/ Accessed: 20.12.2021.
59. Parrilla Vázquez P., Ferrer C., Martínez Bueno M. J., Fernández-Alba A. R. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques. *Trends in Analytical Chemistry.* 2019;115:13–22. DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.022.
60. Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*. 2003;86(2):412–431. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412.
61. Chawla S., Patel H. K., Gor H. N.,Vaghela K. M., Solanki P. P., Shah P. G., Evaluation of matrix effects in multiresidue analysis of pesticide residues in vegetables and spices by LC-MS/MS. *Journal of AOAC International*. 2017;100(3):616–623. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0048.
62. Taha S. M., Gadalla S. A. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta*. 2017;174:767–779. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.080.
63. Chai L.-K., Elie F. A rapid multi-residue method for pesticide residues determination in white and black pepper (Piper nigrum L.). *Food Control*. 2013;32:322–326. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.12.015.
64. Goon A., Khan Z., Oulkar D., Shinde R., Gaikwad S., Banerjee K. A simultaneous screening and quantitative method for the multiresidue analysis of pesticides in spices using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2018;1532:105–111. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.11.066.
65. Hayward D. G., Wong J. W. Organohalogen and organophosphorous pesticide method for ginseng root e a comparison of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry with high resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2009;81:5716–5723. DOI: 10.1021/ac900494a.
66. Du G., Xiao Y., Yang H. R., Wang L., Song Y. l., Wang Y. T. Rapid determination of pesticide residues in herbs using selective pressurized liquid extraction and fast gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2012;35:1922–1932. DOI: 10.1002/jssc.201200169.
67. Maggi L., Carmona M., Campo C. P., Zalacain A., de Mendoza J. H., Mocholí F. A., Alonso G. L. Multi-residue contaminants and pollutants analysis in saffron spice by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008;1209:55–60. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.09.026.
68. Hwang B. H., Lee M. R. Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations. *Journal of Chromatography A*. 2000;898(2):245–256. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00874-8.
69. Ho Y., Tsoi Y., Leung K. S. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2013;775:58–66. DOI: 10.1016/j.aca.2013.02.043.
70. European Commission SANCO. Quality control procedures for pesticide residues analysis. Document SANCO/10232/2006, 24 March. Available at: https://www.eurl-pesticides.eu//library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2006_10232.pdf/ Accessed: 20.12.2021.
71. European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11813/2017, 21–22 November. Available at: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11813_2017-fin.pdf/ Accessed: 20.12.2021.
72. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). Residue Chemistry Test Guideline: OPPTS 860.1340 Residue Analytical Methods; 1996. 12 p. Available at: https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0155-0007/ Accessed: 20.12.2021.
73. Ferrer C., Unterluggauer H., Fischer R. J., Fernández-Alba A. R., Masselter S. Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(1):93–107. DOI: 10.1007/s00216-010-3526-x.
74. Chen L., Song F.-R., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional Chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012;1225:132–140. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.071.
75. de Oliveira Silva R., de Castro R. C., Milhome M. A. L., do Nascimento R. F. Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. *LWT – Food Science and Technology*. 2014;59:21–25. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.035.
76. Bernardi G., Kemmerich M., Ribeiro L. C., Adaime M. B., Zanella R., Prestes O. D. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. *Talanta*. 2016;161:40–47. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.08.015.

REFERENCES

1. European Commission E. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*. 2009;309:1–50.
2. Tripathy V., Basak B. B., Varghese T. S., Saha A. Residues and contaminants in medicinal herbs–A review. *Phytochemistry Letters*. 2015;14:67–78. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.09.003.
3. McKelvey W., Jacobson J. B., Kass D., Barr D. B., Davis M., Calafat A. M., Aldous K. M. Population-based biomonitoring of exposure to organophosphate and pyrethroid pesticides in New York City. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(11–12):1349–1356. DOI: 10.1289/ehp.1206015.
4. Atwood D., Paisley-Jones C. Pesticides Industry Sales and Usage 2008–2012 Market Estimates. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2017. 24 p.
5. Li H.-Z., Zeng E. Y., You J. Mitigating pesticide pollution in China requires law enforcement, farmer training, and technological innovation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2014;33(5):963–971. DOI: 10.1002/etc.2549.
6. NZIER report to the Environmental Protection Authority. Organophosphate and carbamate reassessment; 2015. 26 p. Available at: https://www.epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsno-ar/APP202098/285cfa8da9/APP202098-NZIER-CCD-report.pdf Accessed: 20.12.2021.
7. Singh P., Prasad S. M. Antioxidant enzyme responses to the oxidative stress due to chlorpyrifos, dimethoate and dieldrin stress in palak (Spinacia oleracea L.) and their toxicity alleviation by soil amendments in tropical croplands. *Science of the Total Environment*. 2018;630:839–848. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.203.
8. Yadav I. C., Devi N. L., Zhong G., Li J., Zhang G., Covaci A. Occurrence and fate of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in indoor air and dust of Nepal: Implication for human exposure. *Environmental Pollution*. 2017;229:668–678. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.0895.
9. Eto M. Organophosphorus pesticides: Organic and Biological Chemistry. Boca Raton: CRC Press; 2018. 369 p.
10. Schummer C., Mothiron E., Appenzeller B. M. R., Rizet A., Wennig R., Millet M. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. *Environmental Pollution*. 2010;158(2):576–584. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.08.019.
11. Rajput S., Kumari A., Arora S., Kaur R. Multi-residue pesticides analysis in water samples using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *MethodsX*. 2018;5:744–751. DOI: 10.1016/j.mex.2018.07.005.
12. Mwevura H., Kylin H., Vogt T., Bouwman H. Dynamics of organochlorine and organophosphate pesticide residues in soil, water, and sediment from the Rufiji River Delta, Tanzania. *Regional Studies in Marine Science*. 2021;41:101607. DOI: 10.1016/j.rsma.2020.101607.
13. Ganiev M. M., Nedorezkov V. D. Chemical Protection of Plants. Moscow: KolosS; 2006. 400 p. (In Russ.)
14. Noore S., Ramesh G., Vendan S. E., Nagaraju V. D. Persistence and diffusion behaviour of chlorpyrifos in five different species of vegetables: A comparative analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;217:112208. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112208.
15. Romero-González R., Aguilera-Luiz M. M., Plaza-Bolaños P., Frenich A. G., Vidal J. M. Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: Application for the determination of veterinary drugs in milk. *Journal of chromatography A*. 2011;1218(52):9353–9565. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.074.
16. Naksen W., Prapamontol T., Mangklabruks A., Chantara S., Thavornyutikarn P., Robson M. G., Ryan P. B., Barr D. B., Panuwet P. A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in human plasma and breastmilk using GC-FPD. *Journal of Chromatography B*. 2016;1025:92-104. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.04.045.
17. Kim K.-H., Kabir E., Jahan S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*. 2017;575:525–535. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.
18. van den Dries M. A., Pronk A., Guxens M., Spaan S., Voortman T., Jaddoe V. W., Jusko T. A., Longnecker M. P., Tiemeier H. Determinants of organophosphate pesticide exposure in pregnant women: A population-based cohort study in the Netherlands. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2018;221(3):489–501. DOI: 10.1016/j.ijheh.2018.01.013.
19. Li A. J., Kannan K. Profiles of urinary neonicotinoids and dialkylphosphates in populations in nine countries. *Environment International*. 2020;145:106120. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106120.
20. Habriev R. U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances, 2nd ed. Moscow: Medicina; 2005. 832 p. (In Russ.)
21. Klier B., Häfner E., Albert H., Binder G., Knödler M., Kühn M., Schenk A., Steinhoff B. Pesticide residues in herbal drugs: Evaluation of a database. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2019;15:100223. DOI: 10.1016/j.jarmap.2019.100223.
22. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. V. 2. Moscow: State Pharmacopoeia of the Russian Federation; 2018. Available at: https://femb.ru/femb/pharmacopea.php/ Accessed: 20.12.2021. (In Russ.)
23. Dogheim S. M., Ashraf A., El M. M. S., Alla A. G., Khorshid M. A., Fahmy S. M. Pesticides and heavy metals levels in Egyptian leafy vegetables and some aromatic medicinal plants. *Food Additives and Contaminants*. 2004;21(4):323–330. DOI: 10.1080/02652030310001656361.
24. Abou-Arab A. A. K., Abou Donia M. A. Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. *Food Chemistry*. 2001;72(4):439–445. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00254-5.
25. Łozowicka B., Jankowska M., Rutkowska E., Hrynko I., Kaczyński P., Miciński J. The evaluation of a fast and simple pesticide multiresidue method in various herbs by gas chromatography. *Journal of Nature and Science of Medicine*. 2014;68(1):95–111. DOI: 10.1007/s11418-013-0777-9.
26. Fu Y., Dou X., Zhang L., Qin J., Yang M., Luo J. A comprehensive analysis of 201 pesticides for different herbal species-ready application using gas chromatography-tandem mass spectrometry coupled with QuEChERs. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2019;1125:121730. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121730.
27. Hu Y., Wan L., Zhang J., Yang F., Cao J. Rapid determination of pesticide residues in Chinese materia medica using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012;2(3): 286–293. DOI: 10.1016/j.apsb.2012.03.005.
28. Harris E. S., Cao S., Littlefield B. A., et al. Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines. *Science of the Total Environment*. 2011;409(20):4297–4305. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.032.
29. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Geneva: World Health Organization; 1986. 135 p.
30. Roberts J. R., Reigart J. R. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 6th ed. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs; 2013. 272 p.
31. Kumar V., Upadhay N., Wasit A. B., Singh S., Kaur P. Spectroscopic methods for the detection of organophosphate pesticides–A preview. *Current World Environment*. 2013;8(2):313–318. DOI: 10.12944/CWE.8.2.19.
32. Plumlee K. Clinical Veterinary Toxicology. St Louis, MO: Mosby; 2004. 477 p. DOI: 10.1016/B0-32-301125-X/50024-8.
33. Holden A. J., Chen L., Shaw I. C. Thermal stability of organophosphorus pesticide triazophos and its relevance in the assessment of risk to the consumer of triazophos residues in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(1):103–106. DOI: 10.1021/jf0002589.
34. Guo G., Jiang N., Liu F., Bian Y. Storage stability of organophosphorus pesticide residues in peanut and soya bean extracted solutions. *Royal Society Open Science*. 2018;5(7):180757. DOI: 10.1098/rsos.180757.
35. Alyautdin R. N. Pharmacology. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-MED; 2004. 592 p. (In Russ.)
36. Some organophosphate insecticides and herbicides. Lyon: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2015. 452 p.
37. Vinson F., Merhi M., Baldi I., Raynal H., Gamet-Payrastre L. Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies. *Occupational and Environmental Medicine*. 2011;68(9):694–702. DOI: 10.1136/oemed-2011-100082.
38. Varfolomeev S. D., Efremenko E. N. Organophosphorus neurotoxins. 1st ed. Moscow: RIOR; 2020. 380 p. DOI: 10.29039/02026-5.
39. Saxena G., Bharagava R. M. Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume I: Industrial Waste and Its Management. Singapore: Springer Nature; 2020. 436 p. DOI: 10.1007/978-981-13-1891-7_13.

40. Katsikantami I., Kavvalakis M. P., Tzatzarakis M. N., Nosyrev A. E., Vakonaki E., Tsatsakis A. M. Advances on Biomonitoring of Organophosphorus and Organochlorine Pesticides. *Journal of Siberian Federal University*. 2017;10(2):153–170. DOI: 10.17516/1997-1389-0019.
41. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual, 21st ed. Rome: FAO/WHO Food Standards Programme; 2013, 205 p. Available at: https://www.fao.org/3/a1472e/a1472e00.htm/ Accessed: 20.12.2021.
42. Quality control methods for herbal materials. Geneva: World Health Organization; 2011. 173 p. Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/44479/ Accessed: 20.12.2021.
43. WHO Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva: World Health Organization; 2007. 105 p. Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/43510/ Accessed: 20.12.2021.
44. European Pharmacopoeia 10th edition. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). Available at: https://pheur.edqm.eu/ Accessed: 20.12.2021.
45. The British Pharmacopoeia 2019. Volume I. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. British Pharmacopoeia Commission. Available at: https://www.pharmacopoeia.com/ Accessed: 20.12.2021.
46. United States Pharmacopeia 42. National Formulary 37, Second Supplement. United States Pharmacopeial Convention. Available at: http://www.uspnf.com/ Accessed: 20.12.2021.
47. The Unani Pharmacopoeia of India. 1st Edition, Part 2, Vol. 3. Pharmacopoeia Commission for Indian Medicine & Homoeopathy Ministry of AYUSH, Government of India. Available at: https://main.ayush.gov.in/ Accessed: 20.12.2021.
48. Hygienic standards for pesticide content in environmental objects (the list). Hygienic standards GN 1.2.3539-18. Moscow: Federal'nyy tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2019. 156 p. (In Russ.)
49. EU Pesticide Database. European Commission. Available at: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en/ Accessed: 20.12.2021.
50. Codex Alimentarius. Codex Pesticides Residues in Food Online Database. Available at: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/ Accessed: 20.12.2021.
51. Pharmacopoeia of The People's Republic of China. Vol. 4. Chinese Pharmacopoeia Commission. China Medical Science Press. Available at: http://fuwu.chp.org.cn/ Accessed: 20.12.2021.
52. Japanese Pharmacopoeia. 17th Edition. English Version. The Minister of Health. Labour and Welfare. 2016. Available at: https://www.pmda.go.jp/ Accessed: 20.12.2021.
53. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. Moscow: The Eurasian Economic Commission; 2020. Available at: https://docs.eaeunion.org/ Accessed: 20.12.2021. (In Russ.).
54. Index of World Pharmacopoeias and Pharmacopeial Authorities. Geneva: World Health Organization; 2021. 51 p. Available at: https://www.who.int/publications/m/item/QAS-11.453-Rev.12/ Accessed: 20.12.2021.
55. Multiresidue methods for the gas chromatographic determination of pesticide residues: Interstate standard GOST 32689.2-2014. Moscow: Standartinform; 2015. 29 p. (In Russ.)
56. Fruits, vegetables and derived products. Methods for determination of phosphororganic pesticides. Interstate standard GOST 30710-2001. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov; 2001. 15 p. (In Russ.)
57. European Pharmacopoeia 5th ed. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). Available at: https://pheur.edqm.eu/ Accessed: 20.12.2021.
58. United States Pharmacopeia 38. National Formulary 33, First Supplement. United States Pharmacopeial Convention. Available at: http://www.uspnf.com/ Accessed: 20.12.2021.
59. Parrilla Vázquez P., Ferrer C., Martínez Bueno M. J., Fernández-Alba A. R. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 2019;115:13–22. DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.022.
60. Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*. 2003;86(2):412–431. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412.
61. Chawla S., Patel H. K., Gor H. N.,Vaghela K. M., Solanki P. P., Shah P. G., Evaluation of matrix effects in multiresidue analysis of pesticide residues in vegetables and spices by LC-MS/MS. *Journal of AOAC International*. 2017;100(3):616–623. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0048.
62. Taha S. M., Gadalla S. A. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta*. 2017;174:767–779. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.080.
63. Chai L.-K., Elie F. A rapid multi-residue method for pesticide residues determination in white and black pepper (Piper nigrum L.). *Food Control*. 2013;32:322–326. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.12.015.
64. Goon A., Khan Z., Oulkar D., Shinde R., Gaikwad S., Banerjee K. A simultaneous screening and quantitative method for the multiresidue analysis of pesticides in spices using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2018;1532:105–111. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.11.066.
65. Hayward D. G., Wong J. W. Organohalogen and organophosphorous pesticide method for ginseng root e a comparison of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry with high resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2009;81:5716–5723. DOI: 10.1021/ac900494a.
66. Du G., Xiao Y., Yang H. R., Wang L., Song Y. l., Wang Y. T. Rapid determination of pesticide residues in herbs using selective pressurized liquid extraction and fast gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2012;35:1922–1932. DOI: 10.1002/jssc.201200169.
67. Maggi L., Carmona M., Campo C. P., Zalacain A., de Mendoza J. H., Mocholí F. A., Alonso G. L. Multi-residue contaminants and pollutants analysis in saffron spice by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008;1209:55–60. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.09.026.
68. Hwang B. H., Lee M. R. Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations. *Journal of Chromatography A*. 2000;898(2):245–256. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00874-8.
69. Ho Y., Tsoi Y., Leung K. S. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2013;775:58–66. DOI: 10.1016/j.aca.2013.02.043.
70. European Commission SANCO. Quality control procedures for pesticide residues analysis. Document SANCO/10232/2006, 24 March. Available at: https://www.eurl-pesticides.eu//library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2006_10232.pdf/ Accessed: 20.12.2021.
71. European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11813/2017, 21–22 November. Available at: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11813_2017-fin.pdf/ Accessed: 20.12.2021.
72. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS). Residue Chemistry Test Guideline: OPPTS 860.1340 Residue Analytical Methods; 1996. 12 p. Available at: https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0155-0007/ Accessed: 20.12.2021.
73. Ferrer C., Unterluggauer H., Fischer R. J., Fernández-Alba A. R., Masselter S. Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(1):93–107. DOI: 10.1007/s00216-010-3526-x.
74. Chen L., Song F.-R., Liu Z., Zheng Z., Xing J., Liu S. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional Chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012;1225:132–140. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.071.
75. de Oliveira Silva R., de Castro R. C., Milhome M. A. L., do Nascimento R. F. Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. *LWT – Food Science and Technology*. 2014;59:21–25. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.035.
76. Bernardi G., Kemmerich M., Ribeiro L. C., Adaime M. B., Zanella R., Prestes O. D. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. *Talanta*. 2016;161:40–47. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.08.015.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-152-161
УДК 615.322:615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Актуальные аспекты контроля качества и стандартизации лекарственных препаратов элеутерококка колючего

В. А. Куркин✉, **Т. К. Рязанова**

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (СамГМУ), 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

✉ **Контактное лицо:** Куркин Владимир Александрович. **E-mail:** v.a.kurkin@samsmu.ru

ORCID: В. А. Куркин – https://orcid.org/0000-0002-7513-9352; Т. К. Рязанова – https://orcid.org/0000-0002-4581-8610.

Статья поступила: 10.12.2021 **Статья принята в печать:** 01.04.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В настоящее время все большую популярность приобретают лекарственные средства растительного происхождения. В этом отношении определенный интерес представляют лекарственные растительные препараты на основе корневищ и корней элеутерококка колючего – *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim., синоним *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms, оказывающие адаптогенное, иммуномодулирующее действие, обусловленное преимущественно наличием фенилпропаноидов (элеутерозиды B, D, E, E1). Действующие ФС.2.5.0053.15 «Элеутерококка колючего корневища и корни» и ФС.3.4.0009.18 «Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий» ГФ РФ XIV издания, на наш взгляд, не позволяет в полной мере объективно и унифицированно оценить качество сырья и препаратов.

Цель. Обоснование новых подходов к контролю качества сырья и препаратов элеутерококка колючего, заключающихся в изменении условий пробоподготовки и анализа биологически активных соединений по сравнению с фармакопейными методиками.

Материалы и методы. Образцы лекарственного препарата «Элеутерококка экстракт жидкий» отечественного производителя 5 серий и экспериментальные препараты «Элеутерококка сироп». При проведении анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали стандартный образец сирингина, соответствующий требованиям ВФС 42-2088-92. Методы УФ-спектроскопии и ВЭЖХ применяли с целью определения количественного содержания биологически активных соединений (БАС).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований разработаны иные методические и методологические подходы к определению содержания суммы фенилпропаноидов в пересчете на элеутерозид B (сирингин) методом прямой УФ-спектрофотометрии с использованием стандартного образца сирингина или значения его удельного показателя поглощения. Подобраны новые условия ВЭЖХ-анализа элеутерозида B (сирингина) в препаратах элеутерококка колючего.

Заключение. В результате фитохимического исследования разработаны спектрофотометрическая методика определения суммы фенилпропаноидов в пересчете на сирингин и ВЭЖХ-методика определения элеутерозида B (сирингина) с использованием внешнего стандарта после предварительной очистки суммарных извлечений путем фильтрования через слой алюминия оксида.

Ключевые слова: элеутерококка колючего корни и корневища, *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim., лекарственное растительное сырье, элеутерозиды, фенилпропаноиды, УФ-спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

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

Вклад авторов. Т. К. Рязанова занималась сбором и анализом литературных данных. В. А. Куркин разработал концепцию и методологию исследования. Т. К. Рязанова обработала результаты экспериментальных данных. В. А. Куркин руководил работой. Авторы участвовали в обсуждении результатов и подготовке рукописи.

Для цитирования: Куркин В. А., Рязанова Т. К. Актуальные аспекты контроля качества и стандартизации лекарственных препаратов элеутерококка колючего. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):152–161. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-152-161

Current aspects of Quality Control and Standardization of *Eleutherococcus senticosus* Medicines

Vladimir A. Kurkin✉, **Tatyana K. Ryazanova**

Samara State Medical University, 89, Chapaevskaya str., Samara, 443099, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir A. Kurkin. **E-mail:** v.a.kurkin@samsmu.ru

ORCID: Vladimir A. Kurkin – https://orcid.org/0000-0002-7513-9352; Tatyana K. Ryazanova – https://orcid.org/0000-0002-4581-8610.

Received: 10.12.2021 **Revised:** 01.04.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Nowadays, herbal medicines are becoming more and more popular. In this regard, herbal medicinal preparations based on rhizomes and roots of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim., syn. *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms, are of particular interest. Its have an adaptogenic, immunomodulatory effects mainly due to the presence of phenyl propane compounds: eleutherosides B, D, E, E1. The current pharmacopeial monographs FS.2.5.0053.15 "Eleutherococcus senticosus rhizomes and roots" and FS.3.4.0009.18 "Eleutherococcus senticosus rhizomes and roots liquid extract" in The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV Edition, in our opinion, does not allow to fully objectively and uniformly assess the quality of raw materials and preparations.

© Куркин В. А., Рязанова Т. К., 2022
© Kurkin V. A., Ryazanova T. K., 2022

Aim. The aim is substantiation of new approaches to quality control of raw materials and preparations of *Eleutherococcus senticosus*, consisting in changing the conditions of sample preparation and analysis of active biological compounds in comparison with pharmacopoeial methods.
Materials and methods. Samples of the medicinal preparation "Eleutherococcus extract liquid" of a domestic manufacturer (5 lots) and experimental preparation "Eleutherococcus syrup". When performing high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, a reference sample of syringin was used that met the requirements of pharmacopeial monograph VFS 42-2088-92. Methods of UV-spectroscopy and HPLC were used to determine the quantity of biologically active substances.
Results and discussion. As a result of the research, other methodological and methodological approaches have been developed to determine the content of the total of phenylpropanoids in terms of eleutheroside B (syringin) by direct UV-spectrophotometry using a standard sample of syringin or the value of its specific absorbance. New conditions for HPLC analysis of eleutheroside B (syringin) in preparations of *Eleutherococcus senticosus* have been selected.
Conclusion. As a result of the phytochemical study, a spectrophotometric method was developed for the determination of the total of phenylpropanoids in terms of syringin and an HPLC method for the determination of eleutheroside B (syringin) using an external standard after preliminary purification of the total extracts by filtration through a layer of aluminum oxide.

Keywords: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim., roots and rhizomes, medicinal plant raw materials, eleutherozides, phenylpropanoids, UV-spectroscopy, high performance liquid chromatography

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 K. Ryazanova collected and analyzed the literature data. Vladimir A. Kurkin developed the concept and methodology of the study. Tatyana K. Ryazanova processed the results of the experimental data. Vladimir A. Kurkin supervised the work. All authors participated in the discussion of the results and the preparation of the article.

For citation: Kurkin V. A., Ryazanova T. K. Current aspects of quality control and standardization of *Eleutherococcus senticosus* medicines. *Drug development & registration*. 2022;11(3):152–161. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-152-161

ВВЕДЕНИЕ

Элеутерококк колючий – *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim., синоним *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms, семейство Аралиевые (*Araliaceae*), известный как сибирский женьшень, Ciwujia по-китайски, является одним из наиболее часто используемых адаптогенных растений [1–4]. Данное растение впервые введено в научную медицину советскими учеными в виде экстракта элеутерококка жидкого [5, 6]. В настоящее время элеутерококк колючий широко применяется во всем мире в качестве адаптогена с целью улучшения физических и умственных способностей для нормального физиологического функционирования человеческого организма в условиях стресса [1–3].

В последние десятилетия во всем мире было проведено большое количество химических, фармакологических и клинических исследований корневищ и корней элеутерококка колючего [4, 5]. Значительный объем экспериментальных исследований как *in vitro*, так и *in vivo* продемонстрировали, что препараты элеутерококка колючего обладают антистрессовой, противоязвенной, противорадиационной, противоопухолевой, противовоспалительной и гепатопротекторной активностями и т. д. [1–5]. Типичные пути, стимулируемые биологически активными соединениями элеутерококка колючего, связаны с нейроактивными взаимодействиями лиганд-рецептор, сигнальным путем фосфатидилинозитол-3-киназа/протеинкиназа B [4, 5]. В целом препараты элеутерококка колючего безопасны и не оказывают значительных побочных эффектов при использовании в рекомендуемых дозах. В Российской Федерации разрешены к применению жидкие экстракты элеутерококка разных производителей, корневища и корни элеутерококка входят в состав растительного сбора «Арфазетин»[1].

Сообщается о нескольких классах биологически активных соединений, включая фенилпропаноиды, лигнаны, кумарины, флавоноиды, тритерпеновые сапонины [4, 6–9]. При этом элеутерозид B (сирингин) и элеутерозиды D и E считаются наиболее активными компонентами. Обращает на себя внимание тот факт, что под элеутерозидами понимаются компоненты, выделяемым из корневищ и корней элеутерококка колючего, с разной химической структурой [4, 6–9]. Информация о структуре некоторых элеутерозидов представлена на рисунке 1.

Для стандартизации сырья и препаратов элеутерококка колючего применяются разные подходы.

В Европейской Фармакопее X издания стандартизация сырья элеутерококка колючего предусматривает качественный анализ сырья элеутерококка методом тонкослойной хроматографии в присутст-

[1] Государственный реестр лекарственных средств. 2021. Доступно по: http://www.grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx. Ссылка активна на 13.10.2021.

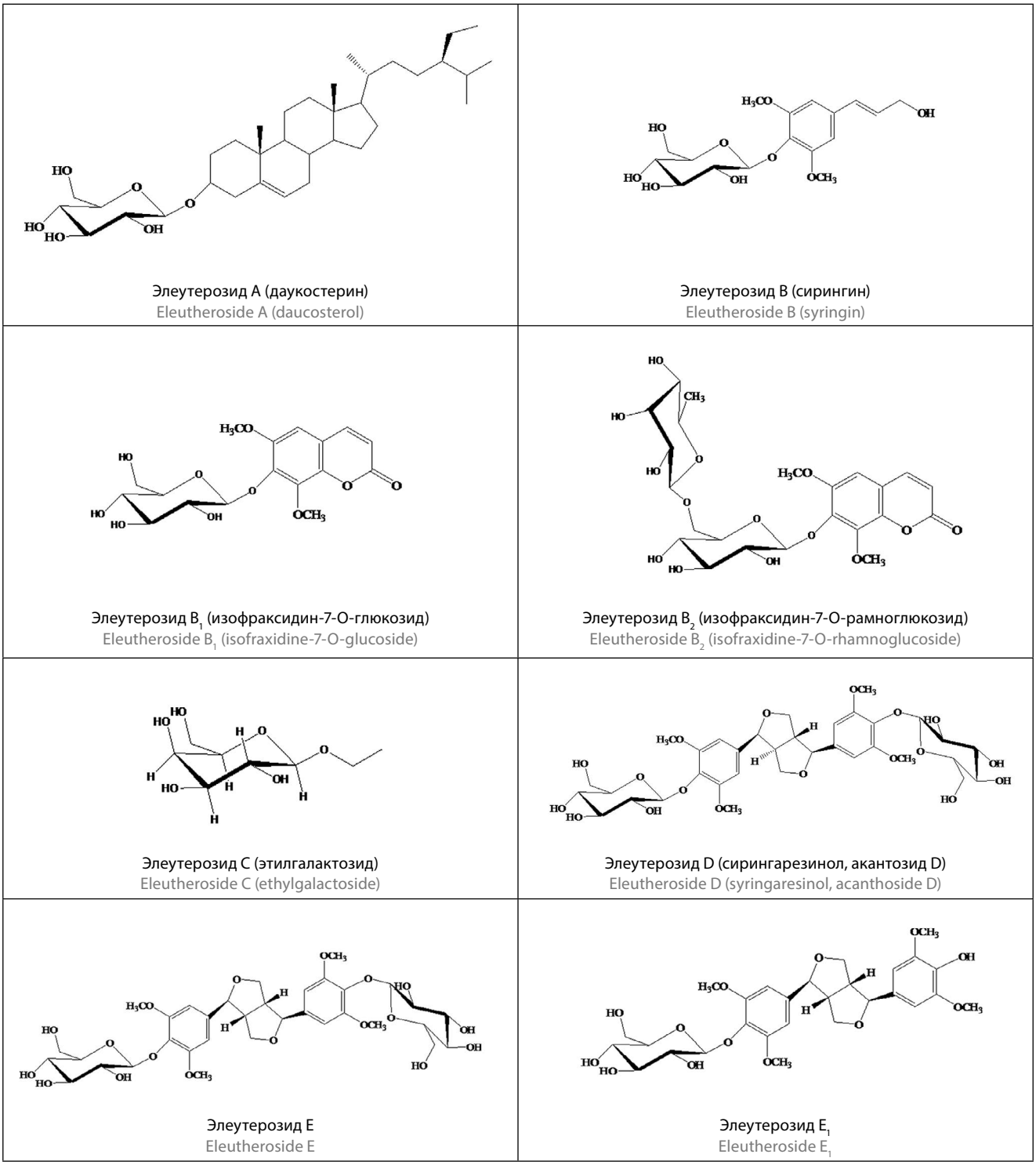


Рисунок 1. Структурные формулы некоторых элеутерозидов

Figure 1. Structural formulas of some eleutherosides

вии стандартных образцов эскулина (кумарин) и каталпола (иридоид) и количественное определение суммы элеутерозидов В и Е с использованием в качестве стандарта феруловой кислоты в градиентном режиме элюирования с детекцией при длине волны 220 нм [10]. Парадокс заключается в том, что в данном случае анализ корневищ элеутерококка колючего осуществляется с использованием трех стандартных образцов, не содержащихся в данном сырье.

В Российской Федерации в действующей фармакопейной статье ФС.2.5.0053.15 «Элеутерококка колючего корневища и корни» качественный анализ основных групп биологически активных соединений включает методы тонкослойной хроматографии в при-

сутствии стандартного образца элеутерозида В, качественные реакции и ВЭЖХ [11][1]. Для оценки подлинности жидкого экстракта из корневищ и корней элеутерококка используют методы ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии и качественные реакции [11][2]. Количественное определение включает оценку содержания элеутерозида В (сирингина) методом ВЭЖХ в градиентном (сырье) или изократическом (жидкий экстракт) режиме элюирования с детекцией при длине волны 266 нм с использованием стандартного образца элеутерозида В и определение содержания суммы элеутерозидов методом УФ-спектрофотометрии [11].

Следует отметить, что методики определения суммы элеутерозидов в сырье и жидком экстракте имеют некоторые отличия. При анализе сырья полученное извлечение упаривают до сухого остатка и растворяют в воде, удаляют липофильные вещества путем многократной обработки водного раствора четыреххлористым углеродом, а целевые соединения экстрагируют смесью хлороформ – спирт 96 % в соотношении 5:1 с последующим измерением оптической плотности разведения полученного раствора при длине волны 278 нм и расчетом содержания суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид В. Отличием методики определения суммы элеутерозидов в жидком экстракте от анализа их содержания в сырье является дополнительная очистка хлороформно-спиртового извлечения через слой алюминия оксида [11].

В то же время, как видно из рисунка 1, элеутерозиды представляют собой различные классы биологически активных соединений, поэтому возникает вопрос о целесообразности и возможности определения их суммы, как требуется в соответствии с фармакопейными статьями на сырье и жидкий экстракт элеутерококка.

Таким образом, фармакопейные статьи – ФС.2.5.0053.15 «Элеутерококка колючего корневища и корни» и ФС.3.4.0009.18 «Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий» ГФ РФ XIV издания, на наш взгляд, не позволяет в полной мере объективно и унифицированно оценить качество сырья и препаратов.

Цель исследования заключалась в обосновании новых подходов к контролю качества сырья и препаратов элеутерококка колючего, заключающихся в изменении условий пробоподготовки и анализа биологически активных соединений по сравнению с принятыми фармакопейными методиками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обоснование и сравнение подходов к определению содержания биологически активных соединений элеутерококка колючего проводилось на примере лекарственных препаратов элеутерококка колючего. В качестве объектов исследования нами были выбраны 5 образцов лекарственного препарата «Элеутерококка экстракт жидкий» отечественного производителя 5 серий и экспериментальные препараты «Элеутерококка сироп». При проведении ВЭЖХ-анализа использовали стандартный образец сирингина, соответствующий требованиям ВФС 42-2088-92, и выделенные ранее профессором В. А. Куркиным образцы индивидуальных соединений (7-О-глюкозид изофраксидина, элеутерозид D, хлорогеновая кислота) в ходе изучения химического состава сырья данного растения [12].

Экспериментальные препараты «Элеутерококка сироп» получали из жидкого экстракта элеутерококка колючего. Определение содержания жидкого экстракта в сиропе проводилось с учетом рекомендуемой дозы зарегистрированного лекарственного препарата. В итоге было определено, что оптимальным является содержание жидкого экстракта в сиропе 5 % от общей массы. Экспериментальные препараты имели следующий составы:

Элеутерококка колючего корневищ и корней жидкий экстракт	5,0
Сахарозы (или сорбита)	64,0
Воды очищенной	до 100,0

Пробоподготовка жидкого экстракта для спектрофотометрического определения суммы фенилпропаноидов

Вариант без предварительной очистки: 1 мл жидкого экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили этанолом 70 % до метки и перемешивали. 5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили этанолом 95 % до метки и перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 266 нм.

Вариант с предварительной очисткой: 1 мл жидкого экстракта фильтровали через слой алюминия оксида («Для хроматографии», фракция 0,04–0,2 мм, нейтральный второй степени активности по Брокману) высотой около 5 мм в стеклянном фильтре диаметром 1,5–2 см в мерную колбу вместимостью 50 мл. 5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили этанолом 95 % до метки и перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 266 нм.

Для сравнения проводили определение суммы элеутерозидов в соответствии с фармакопейными статьями на сырье и жидкий экстракт элеутерококка колючего в условиях без очистки и с дополнительной очисткой через слой алюминия оксида.

Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн от 190 до 500 нм.

[1] ФС.2.5.0053.15 «Элеутерококка колючего корневища и корни».

[2] ФС.3.4.0009.18 «Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий».

Пробоподготовка жидкого экстракта для ВЭЖХ-анализа

Вариант без предварительной очистки: аликвоту жидкого экстракта фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм). 1 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Вариант с очисткой: 10 мл жидкого экстракта фильтровали через слой алюминия оксида высотой около 7–8 мм в стеклянном фильтре диаметром 3–4 см в мерную колбу вместимостью 5 мл. Аликвоту полученного раствора фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм). 1 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Пробоподготовка экспериментального препарата «Элеутерококка сироп» для ВЭЖХ-анализа

Вариант без предварительной очистки: 5,0 г (точная навеска) сиропа взвешивали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой очищенной до метки.

Вариант с очисткой: к 5,0 г (точная навеска) сиропа добавляли 10-кратный объем этанола 95 %, оставляли на некоторое время для осаждения углевода и затем фильтровали через слой алюминия оксида высотой около 5 мм в стеклянном фильтре диаметром примерно 2,5–3 см. Сорбент дважды промывали этанолом 95 % порциями по 5 мл. Полученный раствор упаривали до сухого остатка, растворяли в 3 мл воды очищенной. Аликвоту полученного раствора фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм). 4 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Условия ВЭЖХ-анализа

ВЭЖХ-анализ проводили на микроколоночном хроматографе Милихром-6 (ЗАО «Научприбор», Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором в следующих условиях: обращенная фаза, изократический режим, колонка КАХ-6-80-4 (Сепарон С18), подвижная фаза – ацетонитрил : 1 % раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 15 : 85, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2000 мкл, объем пробы 1–5 мкл. В качестве аналитической длины волн была выбрана длина волны максимума поглощения сирингина – 266 нм, рекомендованная также в ФС.3.4.0009.18 «Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий». Обработку результатов анализа проводили с помощью аппаратно-программного комплекса UniChrom (версия 5.0.19.1162, ООО «Новые аналитические системы», Беларусь).

Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям: специфичность, линейность, правильность (открываемость), прецизионность. Специфичность методики определялась по соответствию времен удерживания стандартного образца элеутерозида B (сирингина) и пиков, соответствующих стандарту на ВЭЖХ-хроматограммах испытуемых растворов, а также по разрешению между наиболее близкими пиками и фактору асимметрии пика сирингина.

Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов сирингина (с концентрациями в диапазоне от 0,064 до 1,275 мг/мл). На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (r^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США).

Правильность методики тестировали путем введения в аликвоту препарата элеутерококка колючего навески стандартного образца сирингина в количестве от 80 % до 120 % от исходного содержания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение спектральных характеристик в ультрафиолетовой и видимой области исходного жидкого экстракта и после очистки путем фильтрования через слой алюминия оксида в сравнении с УФ-спектрами нескольких преобладающих индивидуальных соединений корневищ и корней элеутерококка колючего (фенилпропаноид сирингин и кумарин изофраксидин-7-О-глюкозид) показало, что максимум поглощения исходного жидкого экстракта занимает промежуточное положение между максимумами поглощения сирингина и изофраксидин-7-О-глюкозида. Длина волны максимума поглощения исходного жидкого экстракта составляет 278 ± 2 нм, имеется плечо при 320 ± 2 нм, в то время как максимум поглощения спиртового раствора стандартного образца сирингина приходится на 266 ± 2 нм, изофраксидин-7-О-глюкозида – 294 ± 2 нм и плечо при 336 ± 2 нм (рисунок 2). Промежуточное значение максимума поглощения и выраженное плечо в УФ-спектре исходного экстракта может указывать на вклад обоих доминирующих соединений в кривую поглощения суммарного извлечения.

Изучение спектра поглощения элеутерозида D показало максимум при 272 ± 2 нм, что подтверждает возможный вклад вещества в суммарную кривую поглощения экстракта (рисунок 3). В связи с этим потенциально применимым является определение суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии.

После фильтрования через слой алюминия оксида значение максимума поглощения экстракта смещается в сторону максимума поглощения сирингина (с 278 ± 2 нм до 274 ± 2 нм), увеличивается соотношение длины волны максимума поглощения и длины волны плеча, наблюдаемых в спектре исходного раствора ($A_{278}/A_{320} = 1,46 \pm 0,20$ в исходном экстракте и 2,31 ± 0,25 в экстракте после очистки).

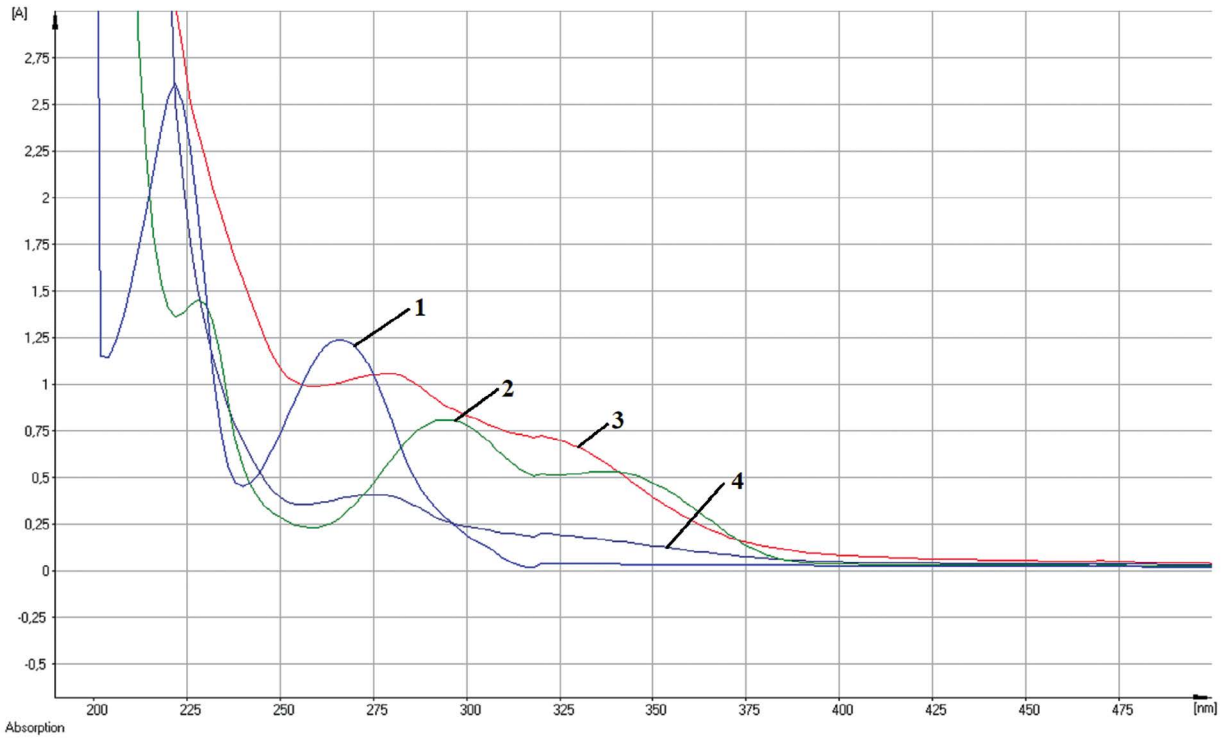


Рисунок 2. Электронные спектры поглощения жидкого экстракта и индивидуальных соединений элеутерококка колючего:

1 – раствор стандартного образца сирингина; 2 – раствор 7-О-глюкозида изофраксидина; 3 – исходный жидкий экстракт корней и корневищ элеутерококка колючего; 4 – экстракт корней и корневищ элеутерококка колючего после очистки путем фильтрования через слой алюминия оксида

Figure 2. Electronic absorption spectra of a liquid extract and individual compounds of *Eleutherococcus senticosus*:

1 – syringin standard sample solution; 2 – isofraxidine 7-O-glucoside solution; 3 – the liquid extract of the roots and rhizomes of *Eleutherococcus senticosus*; 4 – the liquid extract of the roots and rhizomes of *Eleutherococcus senticosus* after purification by filtration through a layer of aluminum oxide

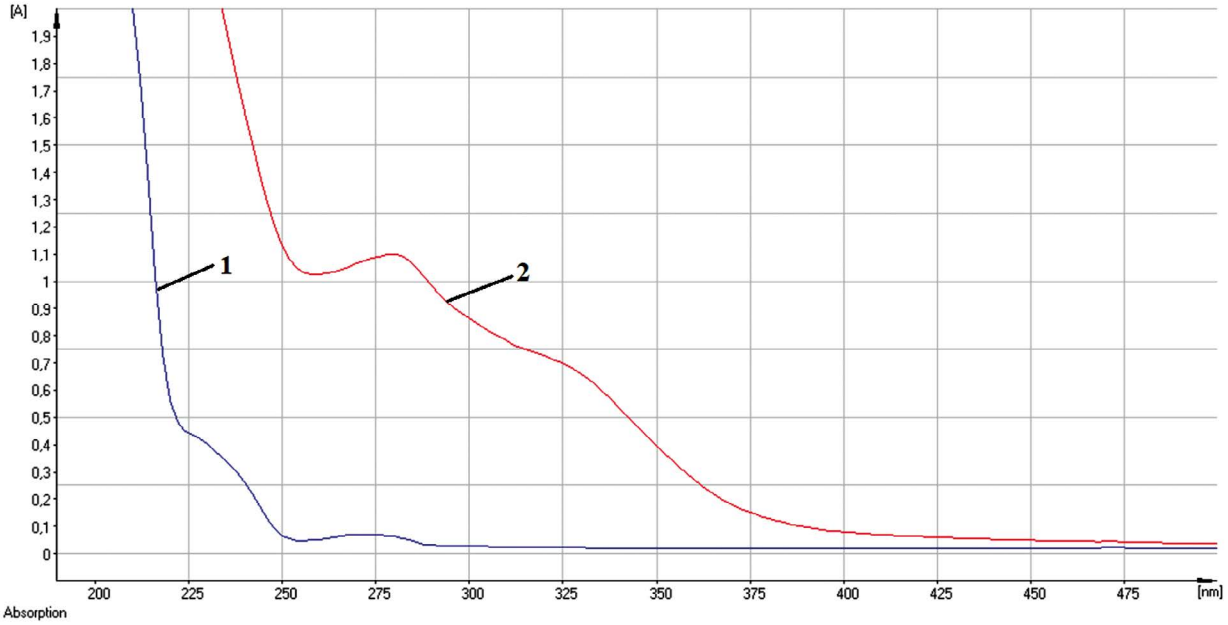


Рисунок 3. Электронные спектры поглощения жидкого экстракта и элеутерозида D:

1 – раствор элеутерозида D; 2 – разведение жидкого экстракта корней и корневищ элеутерококка колючего

Figure 3. Electronic absorption spectra of the liquid extract and eleutheroside D:

1 – solution of eleutheroside D; 2 – dilution of a liquid extract of the *Eleutherococcus senticosus* roots and rhizomes

Спектры поглощения хлороформно-спиртового извлечения, полученного в соответствии с методикой определения суммы элеутерозидов в разделе «Количественное определение» в ФС.3.4.0009.18 «Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий» ГФ РФ XIV издания, имеет максимум поглощения при длине волны 284 ± 2 нм, что отличается от указанного в фармакопейной методике значения 278 нм (рисунок 4). Это различие может быть обусловлено влиянием различных факторов, например вариабельностью химического состава исследуемого лекарственного растительного сырья в зависимости от условий произрастания и др.

Полученное с использованием фармакопейной методики содержание суммы элеутерозидов в жидком экстракте элеутерококка колючего в пересчете на сирингин составило 0,31 ± 0,05 %.

В предлагаемых нами условиях не предусмотрено проведение стадии жидкость-жидкостной экстракции с использованием смеси хлороформа и 96%-го этанола в соотношении 5:1 для извлечения целевых соединений, как это указывается в фармакопейной статье. На наш взгляд, вызывает сомнение, что данная смесь может исчерпывающе извлекать сирингин и более полярные фенилпропаноиды (элеутерозиды D и E) на основании известных физико-химических свойств сирингина (умеренная растворимость в 95%-м этаноле).

Расчет содержания проводится при длине волны 266 нм (максимум поглощения сирингина) с использованием значения удельного показателя поглощения стандартного образца – 430 (ВФС 42-2088-92). Выбор длины волны обусловлен тем, что это значение является относительно постоянным (при предусмотренных условиях анализа), в то время как максимумы поглощения экстрактов элеутерококка колючего могут варьировать в зависимости от разных факторов, влияющих на соотношение компонентов в суммарном извлечении. Кроме того, максимум поглощения стандартного образца сирингина при 266 нм довольно узкий, в то время как УФ-спектры экстракта до и после фильтрования через слой алюминия оксида имеют в этой спектральной области пологий участок полосы поглощения, что также делает оправданным переход на аналитическую длину волны 266 нм.

Принципиально возможно определение суммы элеутерозидов в жидком экстракте элеутерококка колючего в пересчете на элеутерозид D, имеющего более близкий максимум поглощения (272 нм), однако на текущий момент нет зарегистрированных стандартных образцов этого соединения и применение стандартного образца сирингина можно считать более обоснованным ввиду доступности сырьевого источника для его выделения – коры сирени обыкновенной [6].

Более подробно пробоподготовка описана в разделе «Материалы и методы». Содержание суммы фенилпропаноидов составило 0,56 ± 0,03 % и 0,21 ± 0,01 % соответственно для исходного экстракта и экстракта, профильтрованного через слой алюминия оксида. Соответствующие средние значения содержания суммы фенилпропаноидов в экспериментальных 5 % сахарозных и сорбитных сиропах элеутерококка колючего составили 0,030 ± 0,002 %

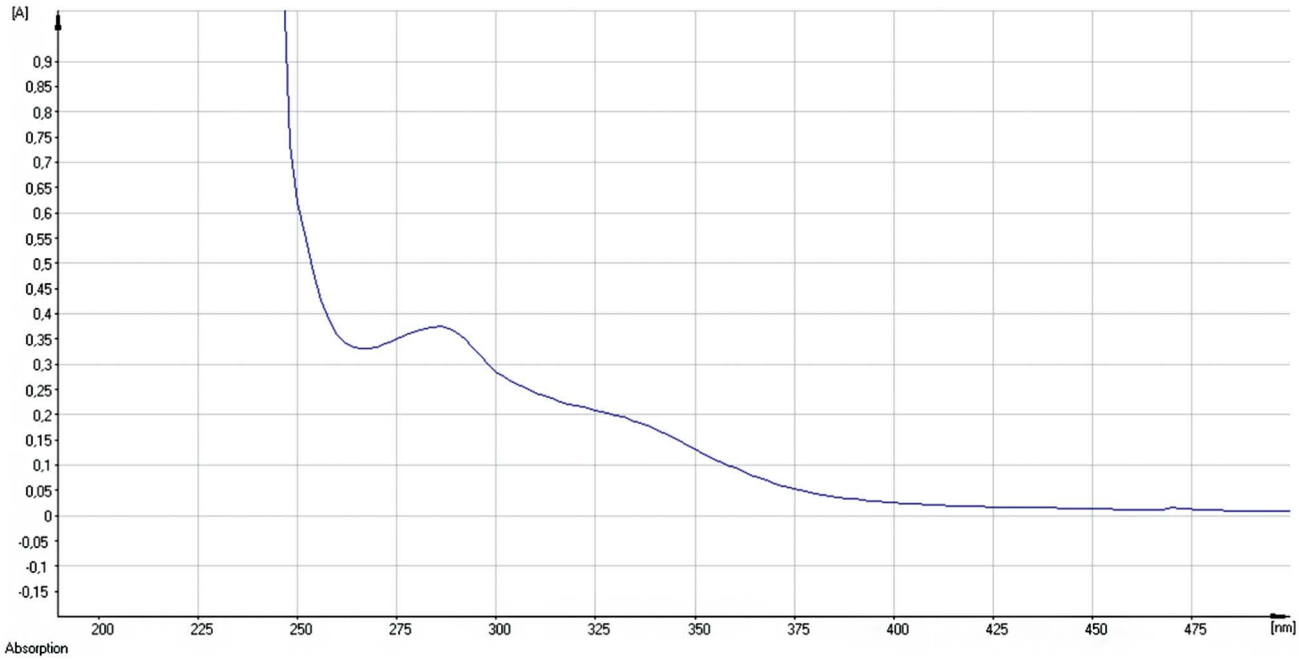


Рисунок 4. Электронный спектр поглощения хлороформно-спиртового извлечения из жидкого экстракта корней и корневищ элеутерококка колючего

Figure 4. Electronic absorption spectrum of chloroform-alcohol extract from a liquid extract of the *Eleutherococcus senticosus* roots and rhizomes

(0,010 ± 0,001 % после очистки через слой алюминия оксида).

Более высокие значения, полученные для образцов без очистки через слой алюминия оксида, по-видимому, свидетельствуют о возможном вкладе других соединений, как видно из приведенных выше УФ-спектров исходного экстракта и индивидуальных компонентов. Возможность проведения очистки через слой алюминия оксида подтверждается также тем фактом, что степени извлечения сирингина и элеутерозида D при фильтровании растворов этих веществ через слой алюминия оксида составляли 98 ± 2 % и 97 ± 2 % соответственно. При этом в отношении кумаринов (элеутерозид B_1) и полифенолов (флавоноидов) известно, что они полностью сорбируются на оксиде алюминия, поэтому не вносят вклад в оптическую плотность после очистки [6], а элеутерозид A (даукостерин) и элеутерозид C (этилгалактозид) не поглощают в области после 220 нм [13,14].

Метрологические характеристики прямой спектрофотометрической методики определения суммы фенилпропаноидов в пересчете на сирингин (с очисткой через слой алюминия оксида) свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата количественного определения в жидком экстракте корней и корневищ элеутерококка колючего с доверительной вероятностью 95 % составляет ±6,24 % (таблица 1).

Таблица 1. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в жидком экстракте элеутерококка колючего

Table 1. Metrological characteristics of the method for the quantitative determination of the amount of phenylpropanoids in a liquid extract of *Eleutherococcus senticosus*

f	$\bar{X}$	*S*	*P*, %	*t* (*P*, *f*)	Δ*X*	*E*, %
8	0,21	0,016667	95	2,31	±0,01	±6,24

На наш взгляд, в совокупности эти данные показывают на принципиальную возможность определения содержания суммы фенилпропаноидов в пересчете на сирингин методом прямой УФ-спектрофотометрии с использованием стандартного образца сирингина или значения его удельного показателя поглощения.

В дальнейшем нами модифицирована методика определения содержания только сирингина (элеутерозида B) – доминирующего, а также в значительной части обусловливающего фармакологическую активность и характерного для сырья и препаратов элеутерококка колючего соединения. В фармакопейных статьях на сырье и жидкий экстракт элеутерококка колючего отмечены некоторые различия в ВЭЖХ-методиках определениях сирингина. Для сырья применяется градиентный, для жидкого экстракта – изократический режим элюирования.

В соответствии с принципом унификации методик анализа в ряду «сырье – фармацевтическая субстанция – препарат» необходимо единообразие контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на его основе. Известно, что при градиентном режиме корректировка условий является более критичной, может привести к некорректной идентификации пиков, их наложению или сдвигам, при которых интересующие вещества могут выйти после указанного времени регистрации хроматограммы. В связи с этим, если разделение интересующих веществ возможно в условиях изократического режима, то для унифицированного анализа биологически активных соединений представляется возможным оставить эти условия. Кроме того, известен опыт успешного анализа содержания сирингина в коре сирени обыкновенной методом ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования [15].

Нами рассмотрена возможность количественного определения содержания сирингина в условиях, используемых для коры и экспериментальных препаратов сирени обыкновенной и описанных в разделе «Материалы и методы».

Оценка пригодности системы, проводимая в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография» показала, что хроматографическая система может быть использована для количественного определения сирингина в препаратах элеутерококка колючего [11].

В текущих условиях проведения анализа среднее время удерживания пика сирингина в жидком экстракте и экспериментальном препарате «Элеутерококка сироп» составляло 2,841 ± 0,085 мин, что соответствует времени удерживания пика сирингина на хроматограмме стандартного образца (рисунок 5). При добавлении раствора сирингина в извлечение на хроматограмме обнаруживается увеличение интенсивности пика сирингина по сравнению с интенсивностью соответствующего пика в испытуемых растворах.

Из рисунка 5 видно, что после фильтрования через слой алюминия оксида происходит очистка пика сирингина от сопутствующего компонента, в связи с этим нами для методики был выбран этап предварительной очистки жидкого экстракта путем фильтрования через слой алюминия оксида. Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации сирингина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,064 до 1,275 мг/мл, однако коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации салидрозида составил 0,9995, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9878. В связи с этим расчет содержания розавина в исследуемых образцах проводили с использованием высоты пика.

При расчете с использованием зависимости высоты пика от концентрации стандартного образца сирингина его содержание в исходном жидком экстракте составило 0,091 ± 0,002 %, после очистки через слой алюминия оксида – 0,079 ± 0,003 %.

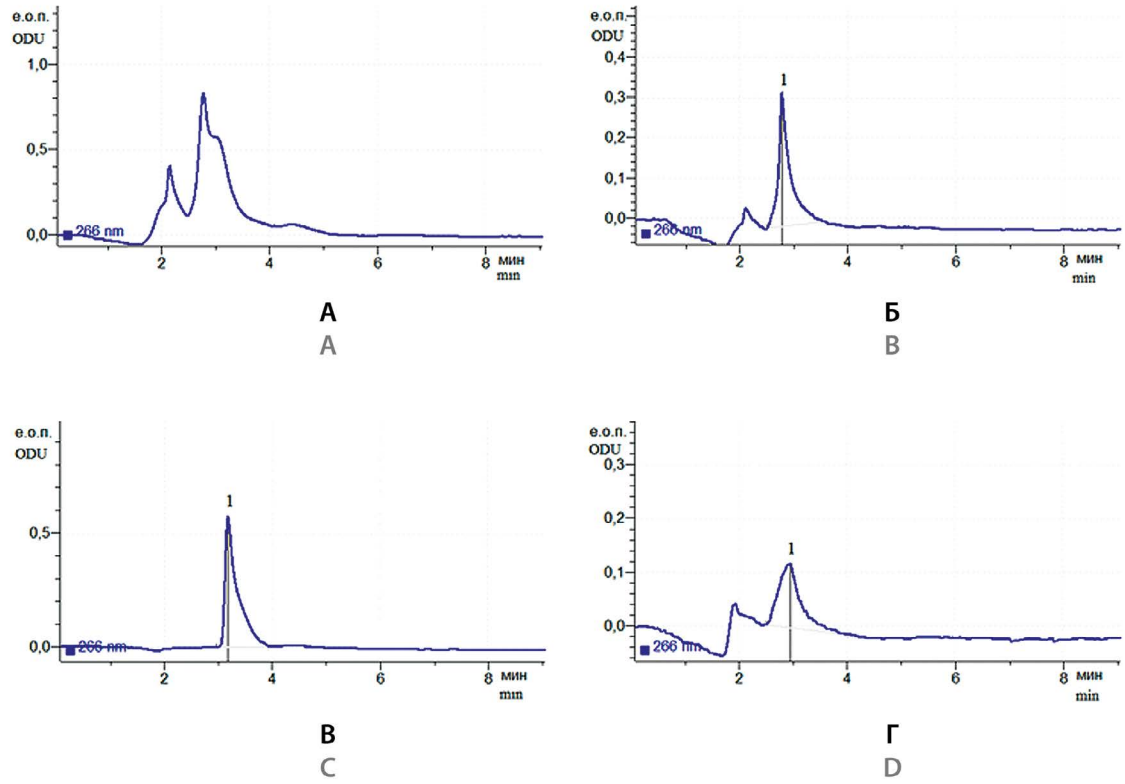


Рисунок 5. ВЭЖХ-хроматограммы жидкого экстракта (до и после очистки) корневищ и корней элеутерококка колючего, экспериментального препарата «Элеутерококка сироп» и раствора стандартного образца сирингина.

А – исходный экстракт корневищ и корней элеутерококка колючего; В – экстракт корневищ и корней элеутерококка колючего после фильтрования через слой алюминия оксида; С – стандартный образец сирингина; D – экспериментальный препарат «Элеутерококка сироп».
Обозначения: 1 – элеутерозиод В (сирингин).

Figure 5. HPLC chromatograms of the liquid extract (before and after purification) of the Eleutherococcus senticosus rhizomes and roots, the experimental preparation "Eleutherococcus syrup" and a solution of a standard sample of syringin.

A – the extract of the Eleutherococcus senticosus rhizomes and roots; B – extract of Eleutherococcus senticosus rhizomes and roots after filtration through a layer of aluminum oxide; C – standard sample of syringin; D – experimental drug «Eleutherococcus syrup».
Designations: 1 – eleutheroside B (syringin).

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа (с очисткой через слой алюминия оксида) свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата определения содержания сирингина в жидком экстракте корней и корневищ элеутерококка колючего с доверительной вероятностью 95 % составляет ±2,87 % (таблица 2). При оценке внутрилабораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения сирингина в первый и второй дни анализа находится в диапазоне от 0,90 до 1,09.

Таблица 2. Метрологические характеристики ВЭЖХ-методики количественного определения сирингина в жидком экстракте элеутерококка колючего

Table 2. Metrological characteristics of the method for the quantitative determination of syringin in a liquid extract of *Eleutherococcus senticosus*

f	$X_{ср.}$	*S*	*P*, %	*t* (*P*, *f*)	Δ*X*	*E*, %
10	0,079	0,0033575	95	2,23	±0,003	±2,87

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора сирингина с известной концентрацией (80 %, 100 % и 120 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 97,8 %.

В проанализированных промышленных образцах «Элеутерококка экстракт жидкий» содержание сирингина варьировало от 0,065 ± 0,003 % до 0,089 ± 0,004 %.

Аналогичная методика была применена для определения содержания сирингина в образцах экспериментального препарата «Элеутерококка сироп». Содержание сирингина в сиропе элеутерококка на основе сахарозы составило 0,0026 ± 0,0003 %, в сиропе на основе сорбита – 0,0029 ± 0,0003 %.

Метрологические характеристики ВЭЖХ-методики свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата определения содержания сирингина в сиропах элеутерококка колючего с доверительной вероятностью 95 % составляет ±6,58 % (таблица 3).

Таблица 3. Метрологические характеристики ВЭЖХ-методики количественного определения сирингина в сиропах элеутерококка колючего

Table 3. Metrological characteristics of the method for the quantitative determination of syringin in syrups of Eleutherococcus senticosus

f	$\bar{X}$	*S*	*P*, %	*t* (*P*, *f*)	Δ*X*	*E*, %
10	0,0026	0,0001723	95	2,23	±0,0003	±6,58

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате фитохимического исследования обоснована целесообразность использования подходов к контролю качества и стандартизации препаратов корневищ и корней элеутерококка колючего, учитывающих данные о химическом составе исследуемого лекарственного растительного сырья. В частности, для анализа препаратов элеутерококка колючего предложены методика определения суммы фенилпропаноидов (не элеутерозидов, под которыми понимаются вещества разной химической структуры), существенно отличающаяся пробоподготовкой, и модифицированная ВЭЖХ-методика определения элеутерозида В (сирингина).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jia A., Zhang Yu., Gao H., Zhang Z., Zhang Ya., Wang Z., Zhang J., Deng B., Qiu Z., Fu Ch. A review of *Acanthopanax senticosus* (Rupr and Maxim.) Harms: From ethnopharmacological use to modern application. *The Journal of Ethnopharmacology.* 2021;268:113586. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113586.
2. Lau K.-M., Yue G. G.-L., Chan Y.-Y. et al. A review on the immunomodulatory activity of *Acanthopanax senticosus* and its active components. *Chinese Medicine.* 2019;14(1):25. DOI: 10.1186/s13020-019-0250-0.
3. Muszyńska B., Łojewski M., Rojowski J., Opoka W., Sułkowska-Ziaja K. Natural products of relevance in the prevention and supportive treatment of depression. *Psychiatria Polska.* 2015;49(3):435–453. DOI:10.12740/PP/29367.
4. Huang L., Zhao H., Huang B., Zheng C., Peng W., Qin L. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie*. 2011;66(2):83–97. DOI:10.1002/chin.201125219.
5. Дардымов И. В. Женьшень, элеутерококк (к механизму биологического действия). М.: Наука; 1976. 184 с.
6. Куркин В. А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). Изд. 5-е, перераб. и доп. Самара: ООО «Полиграфическое объединение «Стандарт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; 2020. 1278 с.
7. Оводов Ю. С., Фролова Г. М., Нефедова М. Ю., Еляков Г. Б. Гликозиды *Eleutherococcus senticosus*. II. Строение элеутерозидов А, В, С и Д. *Химия природных соединений*. 1967;(1):63–64.
8. Wang Y.-H., Meng Y., Zhai C. et al. The Chemical Characterization of *Eleutherococcus senticosus* and Ci-wu-jia Tea Using UHPLC-UV-QTOF/MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):475. DOI: 10.3390/ijms20030475.
9. Guo S., Wei H., Li J. et al. Geographical Distribution and Environmental Correlates of Eleutherosides and Isofraxidin in *Eleutherococcus senticosus* from Natural Populations in Forests at Northeast China. *Forests*. 2019;10(10):872. DOI: 10.3390/f10100872.
10. European Pharmacopoeia, 10th Ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019. 4748 p.
11. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 4. М.; 2018. 1833 с.
12. Куркин В. А., Евстратова Р. И., Запесочная Г. Г. Фенольные соединения корней *Eleutherococcus senticosus*. *Химия природных соединений*. 1991;(6):854–856.
13. Lee J., Weon J. B., Yun B. R., Eom M. R., Ma C. J. Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in *Artemisia apiacea* by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. *Pharmacognosy Magazine.* 2015;11(42):297–303. DOI:10.4103/0973-1296.153082
14. Preedy V. R. Dietary Sugars Chemistry, Analysis, Function and Effects. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2012. 904 p.
15. Куркин В. А., Рязанова Т. К., Серебрякова А. Д. Разработка подходов к стандартизации коры сирени обыкновенной. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;24(7):37–44. DOI: 10.29296/25877313-2021-07-06.

REFERENCES

1. Jia A., Zhang Yu., Gao H., Zhang Z., Zhang Ya., Wang Z., Zhang J., Deng B., Qiu Z., Fu Ch. A review of *Acanthopanax senticosus* (Rupr and Maxim.) Harms: From ethnopharmacological use to modern application. *The Journal of Ethnopharmacology.* 2021;268:113586. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113586.
2. Lau K.-M., Yue G. G.-L., Chan Y.-Y. et al. A review on the immunomodulatory activity of *Acanthopanax senticosus* and its active components. *Chinese Medicine.* 2019;14(1):25. DOI: 10.1186/s13020-019-0250-0.
3. Muszyńska B., Łojewski M., Rojowski J., Opoka W., Sułkowska-Ziaja K. Natural products of relevance in the prevention and supportive treatment of depression. *Psychiatria Polska.* 2015;49(3):435–453. DOI:10.12740/PP/29367.
4. Huang L., Zhao H., Huang B., Zheng C., Peng W., Qin L. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie*. 2011;66(2):83–97. DOI:10.1002/chin.201125219.
5. Dardymov I. V. Ginseng, Eleutherococcus (to the mechanism of biological action). Moscow: Nauka; 1976. 184 p. (In Russ.)
6. Kurkin V. A. Pharmacognosy: a textbook for students of pharmaceutical universities (faculties). 5th ed., rev. and add. Samara: OOO "Poligraficheskoe ob"edinenie "Standart"; FGBOU VO SamGMU Minzdrava Rossii; 2020. 1278 p. (In Russ.)
7. Ovodov Yu. S., Frolova G. M., Nefedova M. Yu., Elyakov G. B. *Eleutherococcus senticosus* glycosides. II. The structure of eleutherosides A, B, C and D. *Chemistry of Natural Compounds*. 1967;(1):63–64. (In Russ.)
8. Wang Y.-H., Meng Y., Zhai C. et al. The Chemical Characterization of *Eleutherococcus senticosus* and Ci-wu-jia Tea Using UHPLC-UV-QTOF/MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):475. DOI: 10.3390/ijms20030475.
9. Guo S., Wei H., Li J. et al. Geographical Distribution and Environmental Correlates of Eleutherosides and Isofraxidin in *Eleutherococcus senticosus* from Natural Populations in Forests at Northeast China. *Forests*. 2019;10(10):872. DOI: 10.3390/f10100872.
10. European Pharmacopoeia, 10th Ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019. 4748 p.
11. Ministry of Health of Russian Federation. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV Edition. Vol. 4. Moscow; 2018. 1833 p. (In Russ.)
12. Kurkin V. A., Evstratova R. I., Zapesochnaya G. G. Phenolic compounds in the roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1991;(6):854–856. (In Russ.)
13. Lee J., Weon J. B., Yun B. R., Eom M. R., Ma C. J. Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in *Artemisia apiacea* by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. *Pharmacognosy Magazine.* 2015;11(42):297–303. DOI:10.4103/0973-1296.153082
14. Preedy V. R. Dietary Sugars Chemistry, Analysis, Function and Effects. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2012. 904 p.
15. Kurkin V. A., Ryazanova T. K., Serebryakova A. D. Development of approaches to standardization of bark of *Syringa vulgaris* L. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii.* 2021;24(7):37–44. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2021-07-06.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-162-172
УДК 615.19.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сырья валериан сомнительной и волжской

О. А. Колосова, О. В. Тринеева✉

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Тринеева Ольга Валерьевна. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: О. А. Колосова – https://orcid.org/0000-0002-3671-5396; О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 08.11.2021 **Статья принята в печать:** 16.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. ИК-спектроскопия в последнее время все чаще используется для выявления различных групп биологически активных веществ (БАВ) в растительных объектах. Известно, что растения способны накапливать разные БАВ. В настоящее время отсутствует достоверная, полная и доступная база ИК-спектров лекарственного растительного сырья (ЛРС), имеющего многокомпонентный состав, необходимая для решения конкретных практических задач. Представляет интерес использование для целей идентификации ЛРС, а также дифференциальной диагностики близкородственных видов и различных сортов лекарственных растений экспресс-методов неразрушающего контроля, которые позволяют проводить анализ сырья в максимально короткое время, сохраняя возможность дальнейшей вегетации. К таким видам трудноразличимого сырья относятся от 9–14 (по разным данным) близкородственных видов растения рода *Valeriana*, входящих, согласно принятой классификации В. И. Грубова с дополнениями и изменениями В. Н. Ворошилова в сборный цикл (*V. officinalis* L.) ряда *Officinales* Grub., и характеризующихся чрезвычайно сходным составом метаболома.

Цель. Целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации лекарственного растительного сырья валериан сомнительной и волжской.

Материалы и методы. Объектами исследования служили корневища с корнями, трава валерианы волжской (*Valeriana wolgensis* Kazak.) и валерианы сомнительной (*Valeriana dudia* L.). Образцы были заготовлены в Воронежской области в 2019 г. на берегу реки Икорец в селе Средний Икорец Лискинского района и в окрестностях села Белогорье Подгоренского района. ИК-спектры были получены без предварительной пробоподготовки на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32.

Результаты и обсуждение. Во всех спектрах исследованных образцов обнаружены полосы поглощения, отражающие общий химический состав. Наблюдались сходные полосы поглощения, отличавшиеся лишь интенсивностью. Особенно близки между собой были спектры одноименных групп сырья (травы и корневищ с корнями) изучаемых видов валериан. В ИК-спектрах порошков изучаемого ЛРС можно выделить характерные для гидроксильных групп циклопентанпиранового скелета валепотриатов полосы поглощения: 3296–3280 $см^{-1}$. Сложная полоса поглощения в области 2958–2844 $см^{-1}$ обусловлена валентными колебаниями многочисленных метильных и метиленовых групп. Деформационные колебания этих же групп дают характерные пики при 1751–1407 $см^{-1}$ и около 700 $см^{-1}$ (790–720 $см^{-1}$ – маятниковые колебания метиленовых групп). При этом среди основных БАВ данного ЛРС преобладают соединения, у которых метиленовые группы замкнуты в ненапряженные циклы, что проявляется полосами в интервале 1420–1400 $см^{-1}$. Полосы поглощения в диапазоне 3296–3280 $см^{-1}$ на ИК-спектрах ЛРС исследуемых видов обусловлены валентными колебаниями гидроксильной группы в межмолекулярных водородных связях. На основании полученных данных были рассчитаны термодинамические характеристики выявленных связей, таких как энергия (E_H) и длина (R). Валепотриаты, содержащие циклопентанпирановый скелет с 5 гидроксильными группами – полигидрооксициклопентанпиран, в изучаемом ЛРС, по данным ИКС, образуют полиассоциаты с характерными частотами поглощения при 3400–3200 $см^{-1}$. Выявленные в спектре специфические частоты можно считать характеристическими для определенного вида сырья валерианы и использовать их в качестве маркеров при определении подлинности и видовой принадлежности методом ИКС.

Заключение. Проведенные исследования показали, что с помощью метода ИК-Фурье-спектроскопии НПВО можно получить индивидуальные ИК-спектры ЛРС различных морфологических групп. Полученные данные, в целом, свидетельствуют о схожести химического состава двух близкородственных видов валериан, заготовленных на территории Воронежской области, что обосновывает, в дополнении с другими исследованиями состава метаболома, возможность их использования наряду с официнальным сырьем валерианы лекарственной. Методом ИК-спектроскопии установлено образование водородных связей и их характер между молекулами БАВ в изучаемом ЛРС. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности используемого метода для экспресс-оценки подлинности ЛРС.

Ключевые слова: корневища с корнями, трава, валериана волжская, валериана сомнительная, ИК-спектроскопия, водородная связь, маркерные полосы поглощения

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

Вклад авторов. О. А. Колосова осуществлял заготовку и сушку образцов сырья, измельчение к проведению анализа. О. В. Тринеева написал текст статьи, осуществлял анализ и обработку полученных результатов.

Для цитирования: Колосова О. А., Тринеева О. В. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сырья валериан сомнительной и волжской. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(3):162–172. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-162-172

© Колосова О. А., Тринеева О. В., 2022
© Kolosova O. A., Trineeva O. V., 2022

Studying the Possibility of Application ir Spectroscopy for Raw Material Identification *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L.

Olga A. Kolosova, Olga V. Trineeva✉

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

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

ORCID: Olga A. Kolosova – https://orcid.org/0000-0002-3671-5396; Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 08.11.2021 **Revised:** 16.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Recently, IR spectroscopy has been increasingly used to identify various groups of biologically active substances (BAS) in plant objects. It is known that plants are capable of accumulating various BAS. Currently, there is no reliable, complete and accessible database of IR spectra of medicinal plant raw materials (MPR), which has a multicomponent composition, which is necessary for solving specific practical problems. It is of interest to use express methods of non-destructive testing for the purpose of identifying medicinal plant raw materials, as well as differential diagnostics of closely related species and various varieties of medicinal plants, which allow the analysis of raw materials in the shortest possible time, while maintaining the possibility of further vegetation. These types of difficult to distinguish raw materials include 9–14 (according to various sources) closely related plant species of the genus *Valeriana*, included, according to the accepted classification of V. I. Grubov with additions and changes by V. N. Voroshilov in the collection cycle (*V. officinalis* L.) of the *Officinales* Grub. series, and are characterized by an extremely similar composition of the metabolome.

Aim. The purpose of this study was to study the possibility of using IR spectroscopy for the identification of MPR of *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L.

Materials and methods. The objects of the study were rhizomes with roots, grass of *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L. Samples were col-lected in the Voronezh region in 2019 on the banks of the Ikorets river in the village of Sredny Ikorets, Liskinsky district and in the vicinity of the village of Belogorye, Podgorensky district. IR spectra were obtained without preliminary sample preparation on a IR Fourier spectrometer VERTEX 70 (Bruker, Germany) by the disturbed total internal reflection method and subsequent pro-cessing with the OMNIC or GRAMS 4/32 program.

Results and discussion. In all spectra of the studied samples, absorption bands reflecting the general chemical composition were found. Similar absorption bands were observed, differing only in intensity. The spectra of similar groups of raw materials (herbs and rhizomes with roots) of the studied species of *Valeriana* were especially close to each other. In the IR spectra of the powders of the medicinal product under study, one can distinguish absorption bands characteristic of the hydroxyl groups of the cyclopentanepyrane skeleton of valepotriates: 3296–3280 cm^{-1}. The complex absorption band in the region of 2958–2844 cm^{-1} is due to stretching vibrations of numerous methyl and methylene groups. Bending vibrations of the same groups give characteristic peaks at 1751–1407 cm^{-1} and about 700 cm^{-1} (790–720 cm^{-1} – pendulum vibrations of methylene groups). At the same time, among the main BAS of this medicinal product, the dominant compounds are those in which the methylene groups are closed in unstressed rings, which is manifested in bands in the range of 1420–1400 cm^{-1}. The absorption bands in the range of 3296–3280 cm^{-1} in the IR spectra of the medicinal product of the studied species are due to stretching vibrations of the hydroxyl group in intermolecular hydrogen bonds. Based on the data obtained, the thermodynamic characteristics of the identified bonds, such as energy (E_H) and length (R), were calculated. Valepotriates containing a cyclopentanepyran skeleton with five hydroxyl groups – polyhydrooxycyclo-pentanepyrane, in the studied medicinal plant, according to IR data, polyassociates are formed with characteristic absorption frequencies at 3400–3200 cm^{-1}. The specific frequencies identified in the spectrum can be considered characteristic for a certain type of raw material of *Valeriana* and can be used as markers in determining the authenticity and species by the IRS method.

Conclusion. The studies have shown that the IR Fourier spectroscopy of the disturbed total internal reflection can be used to obtain individual IR spectra of MPR of various morphological groups. The data obtained, in general, indicate the similarity of the chemical composition of two closely related species of valerian harvested in the Voronezh region, which, in addition to other studies of the metabolome composition, justifies the possibility of their use along with the official raw material of *Valeriana officinalis* L. The formation of hydrogen bonds and their character between BAS molecules in the studied medicinal product was established by IR spectroscopy. The results obtained indicate that the method used is promising for the rapid assessment of the medicinal product authenticity.

Keywords: rhizomes with roots, grass, *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L., IR spectroscopy, hydrogen bond, marker absorption bands

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 A. Kolosova carried out the preparation and drying of samples of raw materials, grinding for analysis. Olga V. Trineeva wrote the text of the article, carried out the analysis and processing of the results.

For citation: Kolosova O. A., Trineeva O. V. Studying the possibility of application ir spectroscopy for raw material identification *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L. *Drug development & registration*. 2022;11(3):162–172. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-162-172

ВВЕДЕНИЕ

Настоящий этап развития фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья (ЛРС) требует применения современных спектральных методов. В частности, в литературе ИК-спектроскопия в последнее время все чаще используется для выявления различных групп биологически активных веществ (БАВ) в растительных объектах [1–5]. ИКС является фундаментальным методом исследования структуры химических соединений. ИК-спектры погло-

щения, отражения или рассеяния несут чрезвычайно богатую информацию о составе и свойствах пробы. По ИК-спектру можно идентифицировать исследуемый образец, определить его основной состав, обнаружить примеси, провести фракционный или структурно-групповой анализ. Методом корреляционного анализа по ИК-спектру пробы также можно определить его физико-химические или биологические характеристики, например, всхожесть семян, калорийность пищевых продуктов, химический состав, размер гранул, плотность и т. д. В настоящее время имеются доступные базы ИК-спектров лекарственных препаратов, токсичных веществ, стероидов и других соединений, имеющих, в основном, однокомпонентный состав.

Известно, что растения способны накапливать разные БАВ. В настоящее время отсутствует достоверная, полная и доступная база ИК-спектров ЛРС, имеющего многокомпонентный состав, необходимая для решения конкретных практических задач [1–5]. Представляет интерес использование для целей идентификации ЛРС, а также дифференциальной диагностики близкородственных видов и различных сортов лекарственных растений экспресс-методов неразрушающего контроля, которые позволяют проводить анализ сырья в максимально короткое время, сохраняя возможность дальнейшей вегетации. К таким видам трудноразличимого сырья относятся от 9–14 (по разным данным) близкородственных видов растения рода *Valeriana*, входящих, согласно принятой классификации В. И. Грубова (1958 г.) с дополнениями и изменениями В. Н. Ворошилова (1959, 1975 гг.) [6, 7] в сборный цикл (*V. officinalis* L.) ряда *Officinales* Grub., и характеризующихся чрезвычайно сходным составом метаболома [8] и особенностями анатомии [9] (таблица 1).

Для идентификации ЛРС может быть более объективным использование ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием. При использовании метода нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), в качестве объекта исследования может выступать измельченное до необходимых размеров ЛРС. В связи с этим представляется актуальным изучение возможности использования метода ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием для оценки подлинности ЛРС. Следует отметить, что использование данного метода в анализе ЛРС крайне мало распространено, лишь в некоторых работах приводятся результаты таких исследований [1–5, 10–12].

Основными действующими БАВ подземных органов валерианы, обусловливающими ценность данного растения и высокую востребованность на фармацевтическом рынке лекарственных растительных препаратов на его основе, являются валепотриаты и эфирное масло, структурные формулы основных компонентов которых представлены на рисунке 1.

Валепотриаты – это эпоксиды бициклических монотерпеновых иридоидов, в которых циклопентанпирановый скелет имеет 5 гидроксильных групп (полигидрооксициклопентанпиран). Два гидроксила образовали эпоксид, а остальные три этерифицированы алифатическими кислотами: один – уксусной, а два – изовалериановой кислотой или ее производными. Основными валепотриатами являются валтрат, изовалтрат, ацевалтрат, дидровальтрат. Как известно, при высушивании свежевыкопанных корней валепотриаты частично подвергаются энзиматическому расщеплению с образованием свободной изовалериановой кислоты и ее производных и иридоида – бардриналя [13].

Наиболее важными компонентами эфирного масла являются сложный эфир борнеола с изовалериановой кислотой – борнилизовалерианат, придающий корневищам с корнями характерный запах. В суммарном виде в масле доминируют производные борнеола, в частности борнилацетат. В небольшом количестве присутствуют сесквитерпеноиды и ароматические производные. Следовательно, для

Таблица 1. Характеристика объектов исследования [13–28]

Table 1. Characteristics of research objects [13–28]

№ п/п No	Объект исследования Object research	Химический состав Chemical composition
1	Трава ВВ и ВС Grass *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L.	Химический состав травы представлен, в первую очередь, флавоноидами, аминокислотами, органическими и гидроксикоричными кислотами, сахарами, дубильными и другими БАВ. Присутствуют свободные валериановая и валереновая кислоты, следы валепотриатов The chemical composition of the herb is represented, first of all, by flavonoids, amino acids, organic and hydroxycinnamic acids, sugars, tanning and other biologically active substances. Free valeric and valerenic acids, traces of valepotriates are present
2	Корневища с корнями ВВ и ВС Rhizomes with roots *Valeriana wolgensis* Kazak. and *Valeriana dudia* L.	Содержат до 2 % эфирного масла, в состав которого входят борнеол, изовалериановая кислота, борнилизовалерианат, пинен, терпинеол, сесквитерпеноиды (валереналь, валеренон), а также свободные валериановая и валереновая кислоты, от 0,8 до 2,5 % валепотриатов (валтрат, изовалтрат, ацевалтрат, дигидровалтрат, изо-валероксидигидровалтрат, валередин, валехлорин, 7-эпидезацетилизовалтрат), тритерпеновые гликозиды, дубильные вещества, алкалоиды, органические кислоты They contain up to 2 % of essential oil, which includes borneol, isovaleric acid, bornilisovalerianate, pinene, terpineol, sesquiterpenoids (valerenal, valerenone), as well as free valeric and valerenic acids, from 0,8 to 2,5 % valepotriates (valtrate, isovaltrate, acevaltrate, dihydrovaltrate, iso-valeroxyhydrovaltrate, valeredin, valechlorin, 7-epidezacetylisaltrate), triterpene glycosides, tannins, alkaloids, organic acids

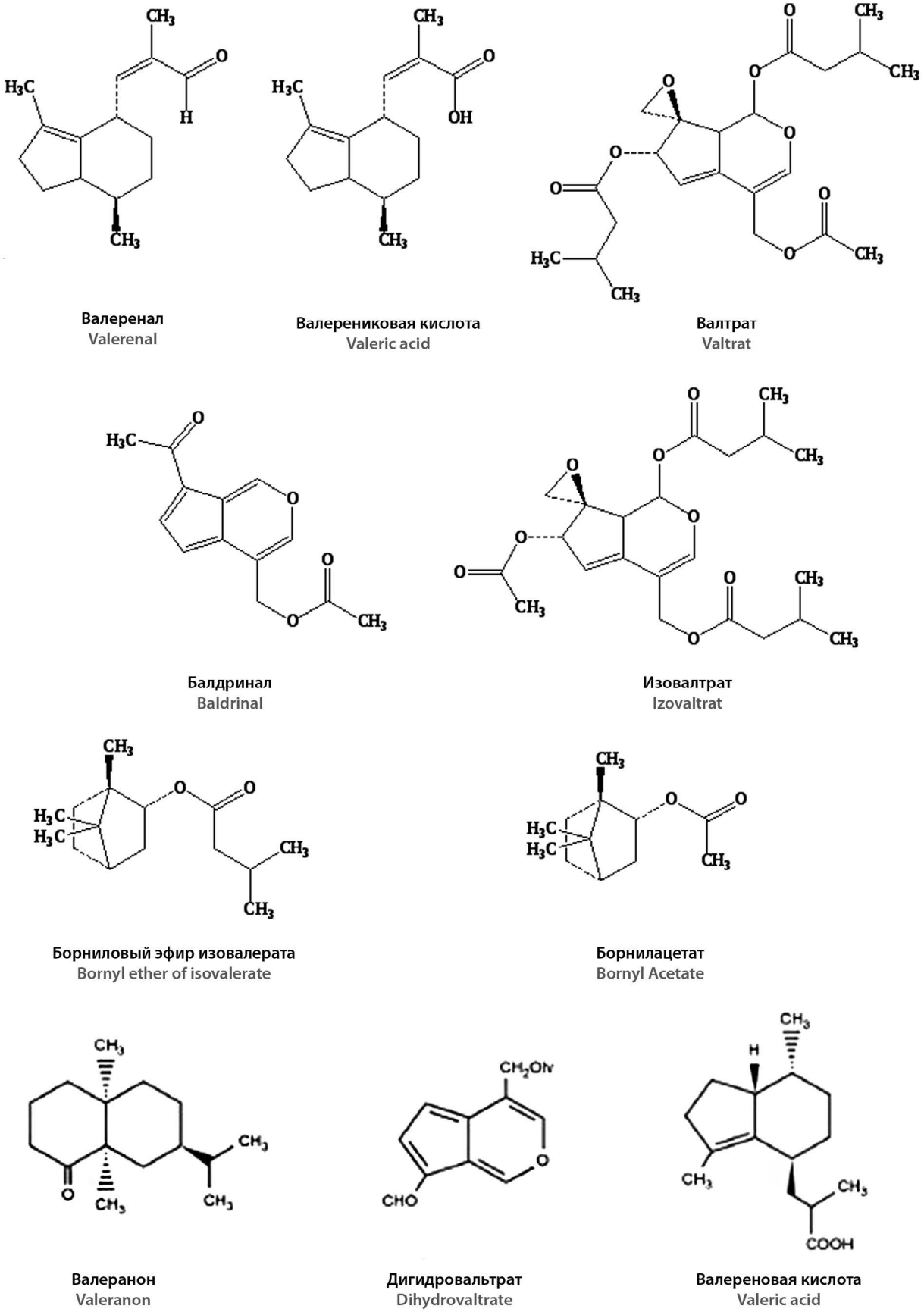


Рисунок 1. **Структурные формулы основных действующих БАВ подземных органов валериан различных видов**

Figure 1. **Structural formulas of the main active biologically active substances of underground organs of *Valerian* of various types**

ИК-спектров должно быть характерно наличие интенсивных полос поглощения, характерных для сложноэфирных и карбонильных групп, эпоксидных структур, кислородсодержащих гетероциклов, непредельных скелетных и ароматических связей.

Химический состав надземных органов даже фармакопейного вида валерианы изучен недостаточно. Однако на основании имеющихся сведений, кроме вышеуказанных максимумов, можно предположить наличие полос, свойственных фенольному гидроксилу флавоноидов, дубильных веществ и гидроксикоричных кислот.

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации лекарственного растительного сырья валериан сомнительной и волжской.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили корневища с корнями, трава валерианы волжской (ВВ) (*Valeriana wolgensis* Kazak.) и валерианы сомнительной (ВС) (*Valeriana dudia* L.). Образцы были заготовлены в Воронежской области в 2019 г. на берегу реки Икорец в селе Средний Икорец Лискинского района и в окрестностях села Белогорье Подгоренского района. Сырье заготавливали согласно общепринятым правилам. Подземные органы заготавливали в конце сентября. Траву заготавливали в июне месяце в период массового цветения. Сушку осуществляли воздушно – теневым способом.

Изучение подлинности объектов исследования методом ИКС проведены с помощью научно-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ВГУ. ИК-спектры были получены без предварительной пробоподготовки на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно выдвинутой научной гипотезе изучение полученных ИК-спектров ЛРС покажет некоторые отличия в рисунке и степени интенсивности полос поглощения для каждого вида сырья в виду незначительных различий в химическом составе (см. таблицу 1). Вид полученных спектров представлен на рисунке 1.

Диапазон основных колебаний молекул, называемый «средний инфракрасный», лежит между волновыми числами от 4000 до 400 см$^{-1}$. Во всех спектрах исследованных образцов обнаружены полосы поглощения, отражающие общий химический состав (рисунок 2). Наблюдались сходные полосы поглощения, отличавшиеся лишь интенсивностью. Особенно близ-

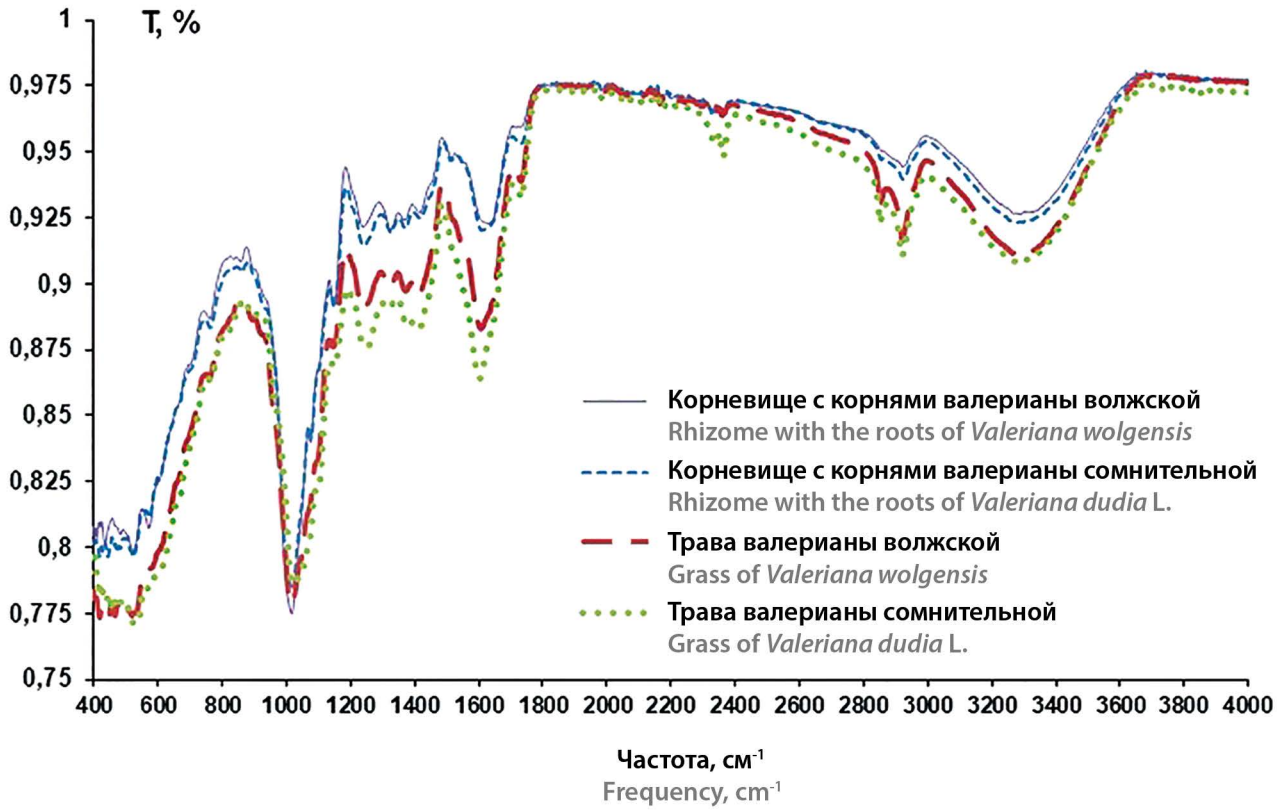


Рисунок 2. ИК-спектры анализируемого сырья валериан (*n* = 3) в диапазоне средних частот

Figure 2. IR spectra of the analyzed raw material *Valerian* (*n* = 3) in the range of medium frequencies

ки между собой были спектры одноименных групп сырья (травы и корневищ с корнями) изучаемых видов валериан.

В ИК-спектрах порошков изучаемого ЛРС можно выделить характерные для гидроксильных групп циклопентанпиранового скелета валепотриатов полосы поглощения: 3296–3280 $см^{-1}$. Сложная полоса поглощения в области 2958–2844 $см^{-1}$ обусловлена валентными колебаниями многочисленных метильных и метиленовых групп. Деформационные колебания этих же групп дают характерные пики при 1751–1407 $см^{-1}$ и около 700 $см^{-1}$ (790–720 $см^{-1}$ – маятниковые колебания метиленовых групп). При этом среди основных БАВ данного ЛРС преобладают соединения, у которых метиленовые группы замкнуты в ненапряженные циклы, что проявляется полосами в интервале 1420–1400 $см^{-1}$. Пики на спектрах при 1600–1500 $см^{-1}$ говорят о присутствии ароматических соединений. Главная полоса при 1629–1604 $см^{-1}$ вызвана двойной связью кислородного цикла валепотриатов. Некоторые полосы в этом диапозоне характерны для бензольного ядра. Полоса в районе 1720 $см^{-1}$ характерна для ацилированной кофейной кислоты [29–33].

Сильный пик при 1460–1440 $см^{-1}$ – деформационные колебания —CH— в —CH_2—, пик слабой интенсивности при 1440 $см^{-1}$ – совместная полоса валентных колебаний C—O и плоскостных деформационных колебаний —OH в —COOH. Необходимо отметить группу слабых полос в области от 1200 $см^{-1}$ до 1400 $см^{-1}$, что характерно для колебаний в —CH_2— карбоновых кислот, число которых дает сведения о длине углеродной цепи.

Колебания, связанные с группой C—O—H: R—O—H (частоты 1450–1250, 750–650 $см^{-1}$), первичные спирты (частоты 1075–1000, 1350–1260 $см^{-1}$), вторичные спирты (частоты 1350–1260 $см^{-1}$), третичные спирты (частоты 1170–1100, 1410–1310 $см^{-1}$), фенолы (частоты 1270–1140, 1410–1310 $см^{-1}$), колебания групп карбоновых кислот: валентные колебания групп COOH (частоты 1760; 1725–1700 $см^{-1}$), связанные OH-группы (частоты 3300–2500 $см^{-1}$), любые группы OH (частоты 995–890 $см^{-1}$), колебания C—O связей (частоты 1320–1210 $см^{-1}$); колебания C—O—C в эфирах ароматических кислот (частоты 1300–1250 $см^{-1}$) [29–33]. Отнесение характеристических частот поглощения в ИК-спектрах ЛРС исследуемых видов валериан приведено в таблицах 2 и 3.

Анализ спектров показывает, что практически у всех исследуемых видов ЛРС с различной степенью интенсивности присутствуют полосы поглощения в указанных диапазонах частот (см. таблицу 3), что может быть использовано для целей установления подлинности и доброкачественности данного ЛРС, и свидетельствует о некоторой устойчивости состава БАВ в сырье растений ряда *Officinales* Grub.

Свободная гидроксильная группа, как известно [29–33], дает максимальное поглощение при 3750–3700 $см^{-1}$. По данным авторов [34, 35], полосы поглощения в интервале 3650–3200 $см^{-1}$ характеризуют наличие группы —OH в межмолекулярных водородных связях. Это обусловлено тем, что при образовании водородной связи силовая постоянная связи O—H уменьшается, а полоса может сдвигаться до 3500–2500 $см^{-1}$ [34, 35]. Чем прочнее возникающее вза-

Таблица 2. Характеристические частоты поглощения в полученных ИК-спектрах изучаемого ЛРС

Table 2. Characteristic absorption frequencies in the obtained IR spectra of the studied medicinal plant raw materials

ЛРС / MPR — Диапазон частот / Frequency range	Трава / Grass		Корневища с корнями / Rhizomes with roots	
	ВВ *Valeriana wolgensis* Kazak.	**ВС** *Valeriana dudia* L.	**ВВ** *Valeriana wolgensis* Kazak.	**ВС** *Valeriana dudia* L.
	ν, $см^{-1}$ (на спектрах) / ν, $см^{-1}$ (on the spectra)			
3600–3200	3280	3284	3288	3296
2960–2850	2912 2844	2918 2850	2939 –	2958 –
2000–1600	1728 1606	1731 1604	– 1629	1751 1608
1556–1512	–	–	1514	1508
1460–1450	1411	1411	1407	1419
1380–1300	1371 1325	1373 1319	1375 1325	1367 1325
1280–1010	1244 1161 – 1014	1245 1149 1095 1020	1269 1163 1060 1016	1238 1172 1076 1016
840–800	–	–	871	860
750–720	773	763	767	763
720–600	–	609	–	–

Таблица 3. Отнесение характеристических частот поглощения в полученных ИК-спектрах исследуемого ЛРС

Table 3. Assignment of characteristic absorption frequencies in the obtained IR spectra of the investigated medicinal plant raw materials

ν, см$^{-1}$ (на спектрах) / ν, см$^{-1}$ (on the spectra)	Интенсивность на спектре / Intensity on the spectra	Функциональная группа / Functional group	Тип колебаний и соответствующий структурный фрагмент / Type of vibration and corresponding structural fragment	Диапазон частот соответствующей функциональной группы [29–33] / Frequency range of the corresponding functional group [29–33]	Интенсивность [29–33] / Intensity [29–33]
3296–3280	Сильная / Strong	Гидроксил в межмолекулярных водородных связях / Hydroxyl in intermolecular hydrogen bonds	валентные колебания O—H в межмолекулярных водородных связях / O-H stretching vibrations in intermolecular hydrogen bonds	3650–3450 (димеры); 3400–3200 (полиассоциаты) / 3650–3450 (dimers); 3400–3200 (polyassociates)	Сильная / Strong
2958–2844	Сильная / Strong	C—CH_3 C—CH_2	валентные колебания связей / stretching vibrations of bonds	2960–2850	Сильная или очень сильная / Strong or very strong
1420–1404	Средняя / Average		ассиметрические деформационные колебания групп / asymmetric bending vibrations of groups	1460–1450	
1375–1319			симметрические деформационные колебания групп / symmetric bending vibrations of groups	1380–1300	
1630–1600	Сильная / Strong	—HC=CH—	валентные колебания связи C=C ароматического ядра / stretching vibrations of the C=C bond of the aromatic nucleus	группа полос 2000–1600 / band group 2000–1600	Слабая / Weak
1269–1149	Средняя / Average	C—OH	симметрические и ассиметрические колебания валентных связей C—O / symmetric and asymmetric vibrations of C—O valence bonds	1280–1010	Сильная / Strong
1095–1014	Сильная / Strong				
1095–1014 871–860	Сильная / Strong	Структура пирана / Structure pirane	–	1097 / 813	Очень сильная / Very strong
773–763	Средняя / Average	—CH_2	$(—CH_2—)_4$, скелетные / $(—CH_2—)_4$, skeletal	750–720	Средняя / Average
1375–1319	Сильная / Strong	—C—O—	валентное, симметрическое, карбоксилат-ион / valence, symmetric, carboxylate ion	1400–1300	Средняя / Average
1751–1728	Сильная / Strong	RCOOR RCOR	валентное, C=O, насыщенная / valence, C=O, saturated	1750–1730	Сильная / Strong
870–860	Средняя / Average	=CH	деформационное, =C—H / deformation, =C—H	885–855	Сильная / Strong
773–609	Средняя / Average	C—H	деформационное, —C—H / deformation, —C—H	745–705	Сильная / Strong

имодействие, тем ниже частота колебаний. Полосы поглощения в диапазоне 3296–3280 см$^{-1}$ на ИК-спектрах ЛРС исследуемых видов (см. рисунок 1) обусловлены валентными колебаниями гидроксильной группы в межмолекулярных водородных связях. На основании полученных данных были рассчитаны термодинамические характеристики [29–35] выявленных связей, таких как энергия (E_H) и длина (R), которые представлены в таблице 4.

Согласно данным авторов [34, 35], выявленные межмолекулярные водородные связи относятся к типу сильных связей, так как энергия их превышает 5 ккал/моль, а длина около 2,7 Å. В случае фенолов, кислородсодержащих гетероциклов данные связи могут приводить к образованию цепей, димеров, колец или пространственных сеток [29–35]. Валепотриаты, содержащие циклопентанпирановый скелет с 5 гидроксильными группами – полигидрооксициклопентанпиран, в изучаемом ЛРС, по данным ИКС, образуют полиассоциаты с характерными частотами поглощения при 3400–3200 см$^{-1}$, тогда как формирование димерных структур БАВ с участием гидроксильных групп различной природы приводит к появлению полосы в диапазоне 3650–3450 см$^{-1}$. Одним из возможных вариантов ассоциации молекул БАВ является образование водородной связи между кислоро-

Таблица 4. Термодинамические характеристики межмолекулярных водородных связей БАВ в ЛРС изучаемых видов по данным ИКС

Table 4. Thermodynamic characteristics of intermolecular hydrogen bonds of biologically active substances in medicinal plant materials of the studied species according to IRS data

№ п/п No	ЛРС MPR	Частота, $см^{-1}$ Frequency, $см^{-1}$	Δν,* $см^{-1}$ Δν,* $см^{-1}$	$E_н$		R, Å
				кДж/моль kJ/mol	ккал/моль kcal/mol	
1	Трава ВВ Grass *Valeriana wolgensis* Kazak.	3280	420	29,70	7,09	2,745
2	Трава ВС Grass *Valeriana dudia* L.	3284	416	29,42	7,03	2,746
3	Корневища с корнями ВВ Rhizomes with roots *Valeriana wolgensis* Kazak.	3288	412	29,14	6,96	2,747
4	Корневища с корнями ВС Rhizomes with roots *Valeriana dudia* L.	3296	404	28,57	6,82	2,750

Примечание. * Смещение частоты поглощения. Формулы расчета термодинамических характеристик приведены в работах [20–21].

Note. * Offset of the absorption frequency. Formulas for calculating thermodynamic characteristics are given [20–21].

дом – ОН группы одной молекулы и водородом гидроксила, в том числе фенольного другой.

Область спектра от 1100 и ниже известна как область «отпечатков пальцев». Сюда попадают полосы поглощения, отвечающие колебаниям групп С—С, С—О, С—N, а также деформационные колебания. В результате сильного взаимодействия этих колебаний отнесение полос поглощения к отдельным связям невозможно. Однако весь набор полос поглощения в этой области является индивидуальной характеристикой соединения. Совпадение всех полос неизвестного (исследуемого) вещества со спектром заведомо известного эталона является прекрасным доказательством их идентичности.

Анализ спектров показывает, что их рисунок строго специфичен для каждого вида сырья, что, по-видимому, определяется некоторыми особенностями химического состава (рисунок 3, таблица 5).

Выявленные в спектре специфические частоты можно считать характеристическими для определенного вида сырья валерианы и использовать их в качестве маркеров при определении подлинности и видовой принадлежности методом ИКС (рисунок 3 и таблицы 5 и 6). Последнее требует уточнения и более подробного изучения на объектах, выращенных и заготовленных в других климатических регионах.

Для ИК-спектров травы валерианы исследуемых видов было характерно наличие специфических полос поглощения в отличие от подземных органов при 561, 536 и 491 $см^{-1}$. ИК-спектры корневищ с корнями имели следующие маркерные полосы, отличающие их от травы при 1076, 570 и 426 $см^{-1}$. Следует отметить, что разные морфологические органы (трава и корневища с корнями) валерианы одного вида имели общие полосы поглощения при 430, 418 и 405 $см^{-1}$ (для валерианы волжской).

Таблица 5. Маркерные полосы поглощения в полученных ИК-спектрах подземных органов валериан изучаемых видов

Table 5. Marker absorption bands in the obtained IR spectra of underground organs of valerian of the studied species

№ п/п No	Корневища с корнями Rhizomes with roots	ν, $см^{-1}$ (на спектрах) ν, $см^{-1}$ (on the spectra)										
		572–570	522–520	486–480	470	459	441	432	426	418–414	410	403
1	ВВ *Valeriana wolgensis* Kazak.	+	+	плечо shoulder	–	–	–	+	–	+	+	+
2	ВС *Valeriana dudia* L.	+	+	480	+	+	+	–	+	+	–	–

Таблица 6. Маркерные полосы поглощения в полученных ИК-спектрах надземных органов валериан изучаемых видов

Table 6. Marker absorption bands in the obtained IR spectra of the aerial organs of Valerian of the studied species

№ п/п No	Трава Grass	ν, $см^{-1}$ (на спектрах) ν, $см^{-1}$ (on the spectra)											
		561	536	518	491	482	474	464	447	430	418	410	405
1	ВВ *Valeriana wolgensis* Kazak.	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
2	ВС *Valeriana dudia* L.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

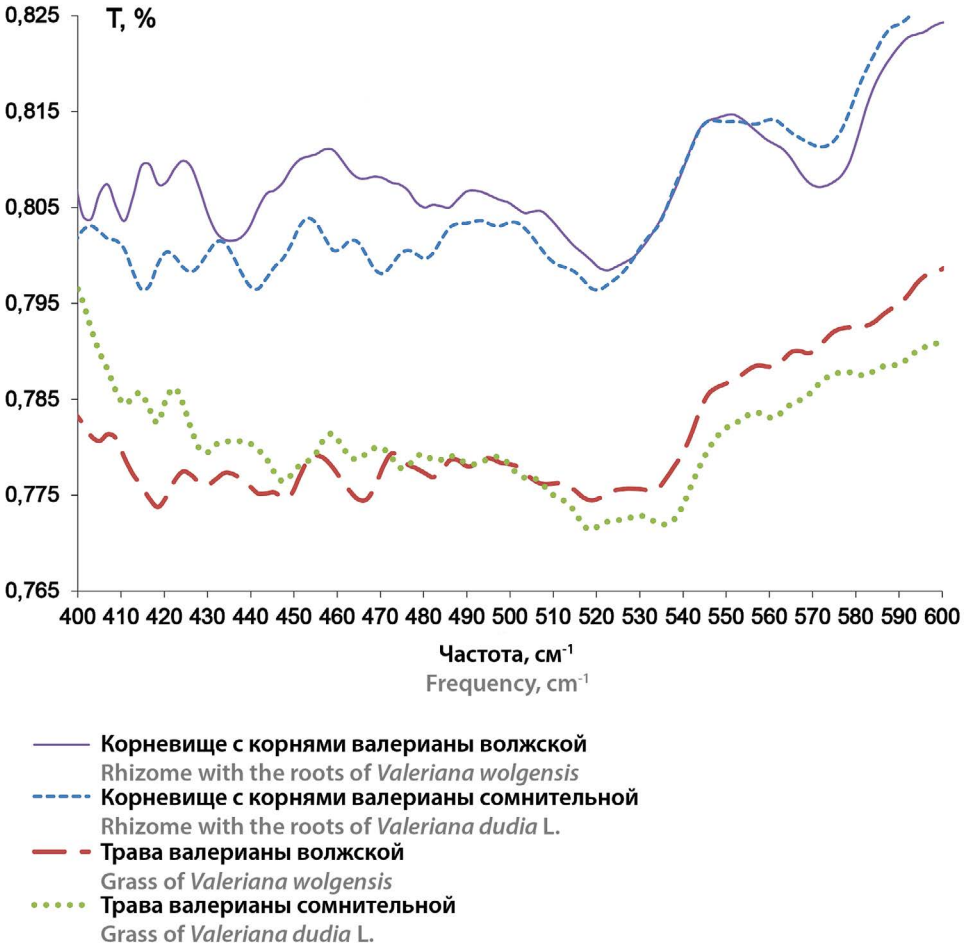


Рисунок 3. ИК-спектр анализируемого сырья валериан (*n* = 3) в области «отпечатков пальцев»

Figure 3. IR spectrum of the analyzed raw material Valerian (*n* = 3) in the area of «fingerprints»

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что с помощью метода ИК-Фурье-спектроскопии НПВО можно получить индивидуальные ИК-спектры ЛРС различных морфологических групп. Экспериментально установлено, что рисунок ИК-спектра и интенсивность полосы поглощения, особенно в области «отпечатков пальцев», являются строго специфичными для каждого вида сырья и позволяют идентифицировать видовую принадлежность при введении в библиотеку прибора стандартного спектра образца. Полученные данные, в целом, свидетельствуют о схожести химического состава двух близкородственных видов валерианы, заготовленных на территории Воронежской области, что обосновывает, в дополнении с другими исследованиями состава метаболома, возможность их использования наряду с официнальным сырьем валерианы лекарственной. Методом ИК-спектроскопии установлено образование водородных связей и их характер между молекулами БАВ в изучаемом ЛРС. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности используемого метода для экспресс-оценки подлинности ЛРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубцова Ю. В. Оценка качества и подлинности плодово-ягодного сырья методом ИК-Фурье-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения. *Техника и технология пищевых производств.* 2017;45(2):126–132.
2. Авилова И. А. Возможность использования метода ИК-спектроскопии для определения качества и подтверждения подлинности состава масел растительного происхождения. *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания.* 2016;4:71–74.
3. Вытовтов А. А. Определение подлинности и обнаружение фальсификации пищевых продуктов методом ИК-Фурье-спектрометрии. *Ученые записки СПб филиала РТА*. 2010;1(35): 193–196.
4. Генералов Е. А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов. *Auditorium*. 2015; 4(08):38–54.
5. Съедин А. В., Орловская Т. В., Гаврилин М. В. Использование метода ИК-спектроскопии для экспресс – идентификации тиогликозидов в растительном сырье. *Современные проблемы науки и образования.* 2014;1:367.
6. Ворошилов В. Н. Лекарственная валериана. М.: АН СССР; 1959. 159 с.
7. Ворошилов В. Н. Официальные виды валерианы СССР. *Бюл. Гл. ботан. сада АН СССР.* 1975;98:39–44.
8. Орлова А. А., Стругар Й., Штарк О. Ю., Жуков В. А., Лужанин В. Г., Повыдыш М. Н. Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор). *Раз-*

работка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(1):97–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105.
9. Колосова О. А., Тринеева О. В., Сорокина А. А., Гудкова А. А. Изучение морфологических и анатомо-диагностических признаков сырья валерианы волжской методом люминесцентной микроскопии. *Фармация*. 2021;8(70):26–30. DOI: 10.29296/25419218-2021-08-04.
10. Чечета О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Исследование водородных связей α-токоферола методом ИК-спектроскопии. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2010;2:164–167.
11. Тринеева О. В., Рудая М. А., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сорта плодов облепихи крушиновидной (*Hippophaes rhamnoides* L.). *Химия растительного сырья*. 2019;1: 301–308. DOI: 10.14258/jcprm.2019014210.
12. Тринеева О. В., Рудая М. А., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Применение ИК-спектроскопии в анализе лекарственного растительного сырья. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2018;(4): 187–194.
13. Станишевская И. Е., Марахова А. И., Грязнов М. Ю., Хазиева Ф. М. Контроль качества лекарственного сырья и фитопрепаратов валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;1(10):122–127.
14. De Almeida T. M., Danielli L. J., Apel M. A., Cassel E., Vargas R. M. F., Von Poser G. L., Müller L. G., Rates S. M. K. A valepotriate-enriched fraction from *Valeriana glechomifolia* Meyer inhibits leukocytes migration and nociception in formalin test in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019;29(4):477–482. DOI: 10.1016/j.bjp.2019.02.004.
15. Fernández S., Rondón M., Rojas J., Morales A., Rojas-Fermin L. Comparison of the Chemical Composition of *Valeriana parviflora* Essential Oils Collected in the Venezuelan Andes in two Different Seasons. *Natural Product Communications*. 2015;10(4):657–659.
16. Das J., Mao A. A., Handique P. J. Terpenoid Compositions and Antioxidant Activities of Two Indian *Valerian* Oils from the Khasi Hills of North-east India. *Natural Product Communications*. 2011;6(1):129–132.
17. Lazarowych N. J., Pekos P. Use of Fingerprinting and Marker Compounds for Identification and Standardization of Botanical Drugs: Strategies for Applying Pharmaceutical HPLC. *Analysis to Herbal Products Drug Information Journal*. 1998;32(2):497–512. DOI: 10.1177/009286159803200222.
18. Letchamo W., Ward W., Heard B., Heard D. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *J. Agric. Food Chem*. 2004;52:3915–3919.
19. Pavlovic M., Kovacevic N., Tzakou O., Couladis M. The essential oil of *Valeriana officinalis* L. s.l. growing wild in Western Serbia. *J. Essent. Oli Res*. 2004;16:397–399.
20. Raal A., Orav A., Arak E., Kailas T., Muurisepp M. Variation in the composition of the essential oil of *Valeriana officinalis* L., roots from Estonia Proc. *Estonian Acad. Sci. Chem*. 2007;56:67–74.
21. Xu Y. M., McLaughlin S. P., Gunatilaca A. A. Sorbifoliavaltrates A-D, diene valepotriates from *Valeriana sorbifolia*. *J. Nat Prod*. 2007;70(12):2045–2048.
22. Bell C. H., Donoghue M. Phylogeny and biogeography of *Valerianaceae (Dipsacales)* with special reference to the South American *Valerians*. *Organisms Diversity & Evolution*. 2005;5:147–159.
23. Bos R., Woerdenbag H. J., Hendriks H., Malingré T. H. Der indische oder pakistanische Baldrian. *Valeriana wallichii* DC (*Valeriana jatamansi*) Jones. *Zeitschrift fur Phytotherapie*. 1992;13:26–34.
24. Wang J., Zhao J., Liu H., Zhou L., Liu Z., Wang J., Han J., Yu Z., Yang F. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two *Valerianaceus* species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules*. 2010;15:6411–6422.
25. Pavlovic M., Kovacevic N., Tzakou O., Couladis M. Composition of the essential oils from the aerial parts of five wild growing *Valeriana* species. *Journal of Essential Oil Research*. 2007;19:433–438.
26. Bardakci H., Demirci B., Yasilada E., Kirmizibekmez H., Can Baser K. H. Chemical composition of the essential oil of the subterranean parts of *Valeriana alliariifolia*. *Records of Natural Product*. 2012;6:89–92.
27. Tzakou O., Couladis M., Pavlovic M., Sokovic M. Composition and antifungal activity of the oil from aerial parts and rhizomes of *Valeriana dioscoridis* from Greece. *Journal of Essential Oil Research*. 2004;16:500–503.
28. Pirbalouti A. G., Ghahfarokhi B. B., Ghahfarokhi S. A. M, Malepoor F. Chemical composition of essential oils from the aerial parts and underground parts of Iranian *Valerian* collected from different natural habitats. *Industrial Crops and Products*. 2015;63:147–151.
29. Казицына Л. А., Куплетская Н. Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа; 1971. 264 с.
30. Литтл Л. Инфракрасные спектры адсорбированных молекул. М.: Мир; 1969. 514 с.
31. Вайсбергера А., ред. Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами. М.: Химия; 1967. 532 с.
32. Наканиси К. Инфракрасная спектроскопия и строение органических соединений. М.: Мир; 1965. 216 с.
33. Отто М. Современные методы аналитической химии. М.: Техносфера; 2003. 544.
34. Чулановского В. М., ред. Водородная связь. М.: Мир; 1964. 462 с.
35. Соколова Н. Д., Чулановского В. М., ред. Водородная связь М.: Наука; 1964. 340 с.

REFERENCES

1. Golubtsova Yu. V. Evaluation of the quality and authenticity of fruit and berry raw materials by the method of FTIR spectroscopy of the disturbed total internal reflection. *Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv*. 2017;45(2):126–132. (In Russ.)
2. Avilova I. A. The possibility of using the method of IR spectroscopy to determine the quality and confirm the authenticity of the composition of vegetable oils. *Tehnologii pishhevoj i pererabatyvajushhej promyshlennosti APK-produkty zdorovogo pitanija*. 2016;4:71–74. (In Russ.)
3. Vytovtov A. A. Determination of authenticity and detection of food counterfeiting by FT-IR spectrometry. *Uchenye zapiski SPb filiala RTA*. 2010;1(35):193–196. (In Russ.)
4. Generalov E. A. Physicochemical approaches to the analysis of natural polysaccharides. *Auditorium*. 2015;4(08):38–54. (In Russ.)
5. Syedin A. V., Orlovskaya T. V., Gavrilin M. V. Using the method of IR spectroscopy for the rapid identification of thioglycosides in plant materials. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2014;1:367. (In Russ.)
6. Voroshilov V. N. Medicinal *Valerian*. Moscow: AN SSSR; 1959. 159 p. (In Russ.)
7. Voroshilov V. N. Official types of *Valerian* of the USSR. *Byul. Gl. botan. sada AN SSSR*. 1975;98:39–44. (In Russ.)
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). *Drug development & registration*. 2021;10(1):97–105. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105.
9. Kolosova O. A., Trineeva O. V., Sorokina A. A., Gudkova A. A. The study of morphological and anatomical-diagnostic features of the Volga valerian raw materials using luminescent microscopy. *Pharmacy*. 2021;8(70):26–30. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-08-04.
10. Checheta O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Investigation of hydrogen bonds of α-tocopherol by IR spectroscopy. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija*. 2010;2:164–167. (In Russ.)
11. Trineeva O. V., Rudaya M. A., Safonova E. F., Slivkin A. I. Study of the possibility of using IR spectroscopy to identify the variety of fruits of sea buckthorn buckthorn (H*ippophaes rhamnoides* L.). *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja*. 2019;1:301–308. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019014210.
12. Trineeva O. V., Rudaya M. A., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Application of IR spectroscopy in the analysis of medicinal plant materials. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija*. 2018;(4):187–194. (In Russ.)
13. Stanishevskaya I. E., Marakhova A. I., Gryaznov M. Yu., Khazieva F. M. Quality control of medicinal raw materials and phytopreparations of *Valeriana officinalis* L. *Drug development & registration*. 2015;1(10):122–127. (In Russ.)

14. De Almeida T. M., Danielli L. J., Apel M. A., Cassel E., Vargas R. M. F., Von Poser G. L., Müller L. G., Rates S. M. K. A valepotriate-enriched fraction from *Valeriana glechomifolia* Meyer inhibits leukocytes migration and nociception in formalin test in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2019;29(4):477–482. DOI: 10.1016/j.bjp.2019.02.004.
15. Fernández S., Rondón M., Rojas J., Morales A., Rojas-Fermin L. Comparison of the Chemical Composition of *Valeriana parviflora* Essential Oils Collected in the Venezuelan Andes in two Different Seasons. *Natural Product Communications.* 2015;10(4):657–659.
16. Das J., Mao A. A., Handique P. J. Terpenoid Compositions and Antioxidant Activities of Two Indian *Valerian* Oils from the Khasi Hills of North-east India. *Natural Product Communications*. 2011;6(1):129–132.
17. Lazarowych N. J., Pekos P. Use of Fingerprinting and Marker Compounds for Identification and Standardization of Botanical Drugs: Strategies for Applying Pharmaceutical HPLC. *Analysis to Herbal Products Drug Information Journal.* 1998;32(2):497–512. DOI: 10.1177/009286159803200222.
18. Letchamo W., Ward W., Heard B., Heard D. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *J. Agric. Food Chem*. 2004;52:3915–3919.
19. Pavlovic M., Kovacevic N., Tzakou O., Couladis M. The essential oil of *Valeriana officinalis* L. s.l. growing wild in Western Serbia. J. *Essent. Oli Res*. 2004;16:397–399.
20. Raal A., Orav A., Arak E., Kailas T., Muurisepp M. Variation in the composition of the essential oil of *Valeriana officinalis* L., roots from Estonia Proc. *Estonian Acad. Sci. Chem.* 2007;56:67–74.
21. Xu Y. M., McLaughlin S. P., Gunatilaca A. A. Sorbifoliavaltrates A-D, diene valepotriates from *Valeriana sorbifolia*. *J. Nat Prod.* 2007;70(12):2045–2048.
22. Bell C. H., Donoghue M. Phylogeny and biogeography of *Valerianaceae (Dipsacales)* with special reference to the South American *Valerians*. *Organisms Diversity & Evolution.* 2005;5:147–159.
23. Bos R., Woerdenbag H. J., Hendriks H., Malingré T. H. Der indische oder pakistanische Baldrian. *Valeriana wallichii* DC (*Valeriana jatamansi*) Jones. *Zeitschrift fur Phytotherapie.* 1992;13:26–34.
24. Wang J., Zhao J., Liu H., Zhou L., Liu Z., Wang J., Han J., Yu Z., Yang F. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two *Valerianaceus* species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules*. 2010;15:6411–6422.
25. Pavlovic M., Kovacevic N., Tzakou O., Couladis M. Composition of the essential oils from the aerial parts of five wild growing *Valeriana* species. *Journal of Essential Oil Research.* 2007;19:433–438.
26. Bardakci H., Demirci B., Yasilada E., Kirmizibekmez H., Can Baser K. H. Chemical composition of the essential oil of the subterranean parts of *Valeriana alliariifolia*. *Records of Natural Product*. 2012;6:89–92.
27. Tzakou O., Couladis M., Pavlovic M., Sokovic M. Composition and antifungal activity of the oil from aerial parts and rhizomes of *Valeriana dioscoridis* from Greece. *Journal of Essential Oil Research*. 2004;16:500–503.
28. Pirbalouti A. G., Ghahfarokhi B. B., Ghahfarokhi S. A. M, Malepoor F. Chemical composition of essential oils from the aerial parts and underground parts of Iranian *Valerian* collected from different natural habitats. *Industrial Crops and Products.* 2015;63:147–151.
29. Kazicyna L. A., Kupletskaja N. B. Application of UV, IR and NMR spectroscopy in organic chemistry. M.: Vysshaja shkola; 1971. 264 p. (In Russ.)
30. Littl L. Infrared spectra of adsorbed molecules. Moscow: Mir; 1969. 514 p. (In Russ.)
31. Vajsbergera A., editor. Establishment of the structure of organic compounds by physical and chemical methods. Moscow: Himija; 1967. 532 p. (In Russ.)
32. Nakanisi K. Infrared spectroscopy and the structure of organic compounds. Moscow: Mir; 1965. 216 p. (In Russ.)
33. Otto M. Modern methods of analytical chemistry. Moscow: Tehnosfera; 2003. 544. (In Russ.)
34. Chulanovskogo V. M., editor. Hydrogen bond. Moscow: Mir; 1964. 462 p. (In Russ.)
35. Sokolova N. D., Chulanovskogo V. M., editors. Hydrogen bond. Moscow: Nauka; 1964. 340 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-173-179
УДК 543.544.943.3.068.7:582.711.16:582.43(045)

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Исследование корневищ и корней родиолы розовой методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Н. В. Скляревская✉, **Ю. С. Алексеева, А. О. Понкратова, Е. В. Жохова**

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14А

✉ **Контактное лицо:** Скляревская Нелли Владимировна. **E-mail:** nelly.sklyarevskaya@pharminnotech.com

ORCID: Н. В. Скляревская – https://orcid.org/0000-0002-3735-4510; Ю. С. Алексеева – https://orcid.org/0000-0003-0780-9913;
А. О. Понкратова – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Е. В. Жохова – https://orcid.org/0000-0002-9763-096X.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 16.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В статье представлены результаты исследования с использованием метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) образцов разных сортов корневищ и корней родиолы розовой, выращиваемой в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ).

Цель. Провести сравнительный анализ методом ВЭТСХ образцов подземных органов родиолы розовой, выращиваемой в питомнике лекарственных растений СПХФУ.

Материалы и методы. ВЭТСХ анализ выполняли на приборе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин MERCK HPTLC plates silica gel 60 F 254 размером 20 × 10 см. Извлечения из сырья получали, используя ультразвуковую ванну «Сапфир – 4,0 ТТЦ» (Россия). Корневища и корни *Rhodiola rosea* были заготовлены в августе 2019 г. в питомнике лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская обл., Всеволожский р-н, 38 км Приозерского шоссе).

Результаты и обсуждение. В ходе исследования из подземных органов родиолы розовой получали извлечения, используя в качестве экстрагентов спирты этиловый 70 % и метиловый. Полученные растворы изучали методом ВЭТСХ в системе растворителей этилацетат – метанол – вода – муравьиная кислота (77 : 13 : 10 : 2). После проведения сканирующей денситометрии при 254 нм было обнаружено, что разделение метанольных извлечений в данной системе растворителей осуществляется гораздо лучше, чем этанольных. Сравнивали денситограммы отдельных треков между собой для того, чтобы выявить образцы корневищ и корней родиолы розовой с большим содержанием биологически активных соединений. В результате сравнения треков 18 образцов подземных органов *Rhodiola rosea* (экстрагент – спирт этиловый 70 %), в числе перспективных для последующего исследования и культивирования были предложены образцы № 6 и 17.

Заключение. В результате анализа спиртовых извлечений из корневищ и корней родиолы розовой методом ВЭТСХ было установлено, что большим содержанием биологически активных соединений отличаются образцы 6 (Томск, Россия) и 17 (сортов Valla Di Aposta/Hirvos, страна происхождения – Италия/Финляндия).

Ключевые слова: *Rhodiola rosea*, родиола розовая, ВЭТСХ

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

Вклад авторов. Ю. С. Алексеева, Н. В. Скляревская и А. О. Понкратова выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. Н. В. Скляревская и Е. В. Жохова подготовили текст рукописи. 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: Скляревская Н. В., Алексеева Ю. С., Понкратова А. О., Жохова Е. В. Исследование корневищ и корней родиолы розовой методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(3):173–179. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-173-179

Research of *Rhodiola rosea* Rhizomes and Roots Using High Performance Thin Layer Chromatography

Nelli V. Sklyarevskaya✉, **Yulia S. Alexeeva, Anastasiia O. Ponkratova, Elena V. Zhokhova**

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Nelli V. Sklyarevskaya. **E-mail:** nelly.sklyarevskaya@pharminnotech.com

ORCID: Nelli V. Sklyarevskaya – https://orcid.org/0000-0002-3735-4510; Yulia S. Alexeeva – https://orcid.org/0000-0003-0780-9913;
Anastasiia O. Ponkratova – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Elena V. Zhokhova – https://orcid.org/0000-0002-9763-096X.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 16.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The research results obtained through the analysis of different varieties of *Rhodiola rosea* rhizomes and roots using high-performance thin layer chromatography (HPTLC), grown in the Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University (SPCPU) medicinal plants nursery garden, are represented.

© Скляревская Н. В., Алексеева Ю. С., Понкратова А. О., Жохова Е. В., 2022
© Sklyarevskaya N. V., Alexeeva Yu. S., Ponkratova A. O., Zhokhova E. V., 2022

Aim. To carry out a comparative analysis of *Rhodiola rosea* rhizomes and roots samples, grown in the SPCPU medicinal plants nursery using HPTLC.
Materials and methods. HPTLC analysis was performed on a CAMAG device (Switzerland), using MERCK HPTLC silica gel 60 F 254, 20 × 10 cm plates. Extracts were obtained from raw materials using an ultrasonic bath "Sapphire-4.0 TTC" (Russia). The *Rhodiola rosea* rhizomes and roots were harvested in the SPCPU medicinal plants nursery garden (Leningrad Region, Vsevolozhsk district, Priozerskoe Highway, 38 km) in August 2019.
Results and discussion. In the course of the research, extracts from *Rhodiola rosea* rhizomes and roots were obtained using 70 % ethyl alcohol and methyl alcohol as extractants. The extracts were investigated by HPTLC in ethyl acetate – methanol – water – formic acid (77 : 13 : 10 : 2) solvent system. After scanning densitometric analysis at 254 nm, the much better separation of methanol extracts in this solvent system was found than ethanol extracts. The densitograms of individual tracks were compared with each other in order to identify samples of *Rhodiola rosea* rhizomes and roots with a higher biologically active compounds content. As a result of the comparison of 18 samples tracks of the *Rhodiola rosea* rhizomes and roots (the extractant was ethyl alcohol 70 %), samples № 6 and 17 have been proposed as promising for further research and cultivation.
Conclusion. As a result of the analysis of alcohol extracts from *Rhodiola rosea* rhizomes and roots by HPTLC, the samples 6 (Tomsk, Russia) and 17 (Valla Di Aposta/Hirvos varieties, country of origin – Italy/Finland) were found to have a higher content of biologically active compounds.

Keywords: *Rhodiola rosea*, roseroot, HPTLC

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. Yulia S. Alexeeva, Nelli V. Sklyarevskaya and Anastasiia O. Ponkratova performed the experimental part and interpreted the results. Nelli V. Sklyarevskaya and Elena V. Zhokhova took part in preparing of the article text. 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: Sklyarevskaya N. V., Alexeeva Yu. S., Ponkratova A. O., Zhokhova E. V. Research of *Rhodiola rosea* rhizomes and roots Using High Performance Thin Layer Chromatography. *Drug development & registration*. 2022;11(3):173–179. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-173-179

ВВЕДЕНИЕ

Родиола розовая – *Rhodiola rosea* L. – представитель сем. толстянковых – *Crassulaceae,* корневища и корни которого используются в официнальной медицине в качестве адаптогенного средства. Также выявлены антиоксидантная, анксиолитическая, антидепрессантная, ноотропная, иммуномодулирующая, противоопухолевая и другие виды активности [1, 2–10]. Химический состав вторичных метаболитов подземных органов *R. rosea* очень разнообразен. Основными действующими компонентами, обусловливающими адаптогенную активность лекарственного растительного сырья этого растения, являются фенилпропаноиды (розавин, розарин, розин) и простые фенольные соединения (тирозол, салидрозид) [1, 2, 11–14]. *R. rosea* встречается в России, арктической и горной Европе, Монголии, Китае, Северной Америке [1, 2]. Природные запасы родиолы розовой в Российской Федерации существенно сократились ввиду практически нерегулируемых заготовок подземных органов растения [1]. Поэтому расширение сырьевой базы за счет интродукции *R. rosea* является важным направлением для сохранения этого вида.

Цель исследования – сравнительный анализ методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) образцов подземных органов родиолы розовой, выращиваемой в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были 18 образцов корневищ и корней родиолы розовой разных сортов. Подземные органы *R. rosea* заготовили в фазу плодоношения в августе 2019 г. в питомнике лекарственных растений СПХФУ.

ВЭТСХ анализ выполняли на приборе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин MERCK HPTLC plates silica gel 60 F 254 размером 20 × 10 см. Образцы наносили на пластины методом распыления в виде полос длиной 8 мм с отступом справа 20 и 8 мм от нижнего края с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5. Элюирование проводили в вертикальной автоматической камере с двумя желобками Twin Trough Chamber CAMAG ADC 2 с насыщением 20 мин (с фильтровальной бумагой). Изображения получали с помощью CAMAG® TLC Visualizer 2.

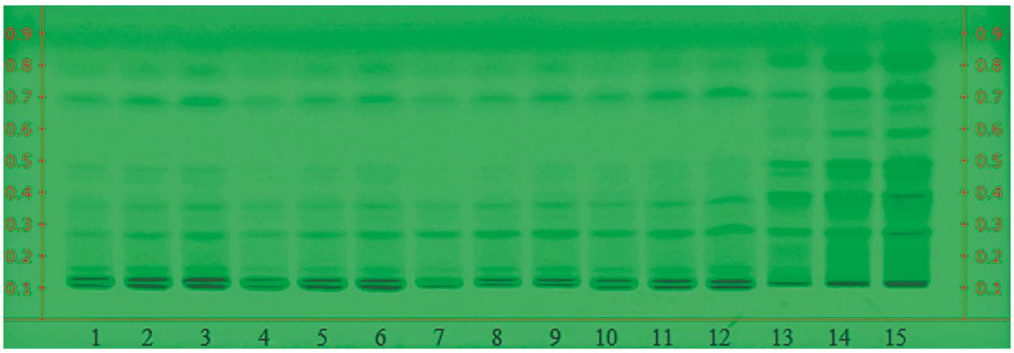


Рисунок 1. **Хроматограмма образцов 1–4 (фотография при 254 нм)**

Figure 1. **Chromatogram of samples 1–4 (picture at 254 nm)**

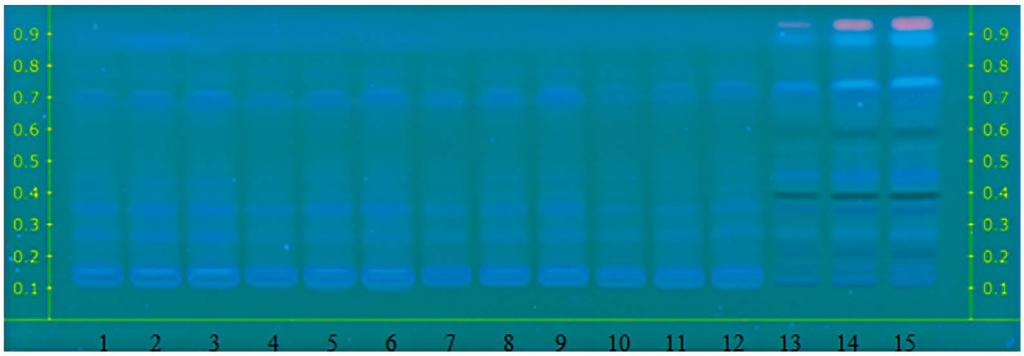


Рисунок 2. **Хроматограмма образцов 1–4 (фотография при 366 нм)**

Figure 2. **Chromatogram of samples 1–4 (picture at 366 nm)**

Сканирующую денситометрию проводили на спектроденситометре CAMAG® Scanner 3. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения VisionCATS[1] [15–18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы корневищ и корней родиолы розовой сушили при 70 °С методом инфракрасной сушки. Высушенное сырье измельчали на электрорезке ТУ 37-53 тип 622-1-М, просеивали через сито с отверстиями размером 0,25 мм. Извлечения из сырья с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 70 % получали по методике Государственной фармакопеи Российской Федерации 14 издания с применением ультразвуковой ванны «Сапфир – 4,0 ТТЦ» (Россия)[2].

На первом этапе спиртовые растворы наносили на пластины для ВЭТСХ по 15, 20, 25 мкл (образцы 1–4, треки 1–12) (рисунки 1, 2). Образцы 5, 7–12 по 20 мкл (треки 1, 4–9, рисунок 3), 6 по 15 и 20 мкл (треки 2,3, рисунок 3), 13–18 по 20 мкл (треки 1–7, рисунок 4).

Для сравнения некоторые образцы экстрагировали метанолом. Метанольные извлечения получали по следующей методике: точную навеску (0,5 г) измельченного до размера частиц 0,25 мм сырья, помещали в колбу со шлифом, прибавляли 5 мл метанола. Колбы помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин при температуре 60 °С. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр[3]. Растворы наносили на ВЭТСХ-пластины в объеме 5, 10, 15 мкл (образец 1, треки 13–15) (рисунки 1, 2). Образцы 2–4 (треки 10–15, рисунок 3), 5, 6 (треки 8–11, рисунок 4) по 10 и 15 мкл.

Затем пластины помещали в автоматическую камеру с системой растворителей этилацетат – метанол – вода – муравьиная кислота (77:13:10:2). Элюирование прекращалось автоматически, когда фронт растворителей достигал 70 мм от линии старта. Изображение пластин получали с помощью CAMAG® TLC Visualizer 2 в видимом и УФ-свете при длинах волн 254 и 366 нм (рисунки 1–4).

[1] CAMAG: World Leader in Planar Chromatography. Available at: https://www.camag.com. Accessed: 25.02.2022.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т. 4. ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни». Доступно по: http://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 25.02.2022.

[3] HPTLC Association. Available at: https://www.hptlc-association.org. Accessed: 25.02.2022.

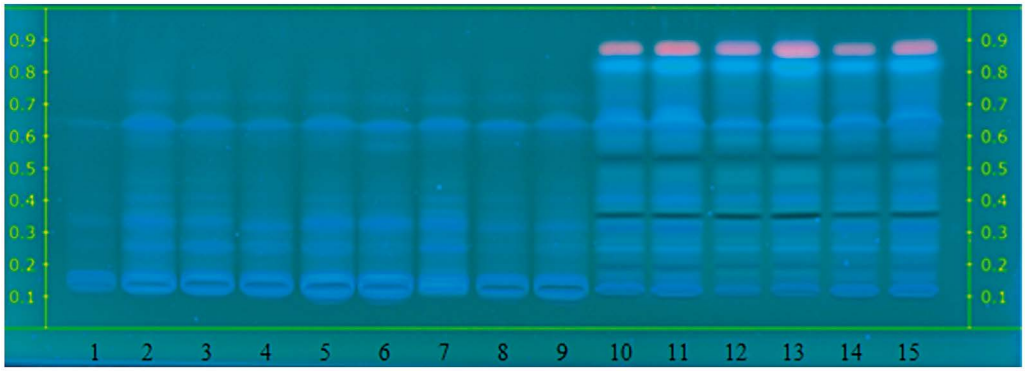


Рисунок 3. **Хроматограмма образцов 5–12 (Э) и 2–4 (М) (фотография при 366 нм).**

Примечание. Э – экстрагент этанол 70 %; М – экстрагент метанол

Figure 3. **Chromatogram of samples 5–12 (E) and 2–4 (M) (picture at 254 nm).**

Note. E – extractant ethanol 70 %; M – extractant methanol

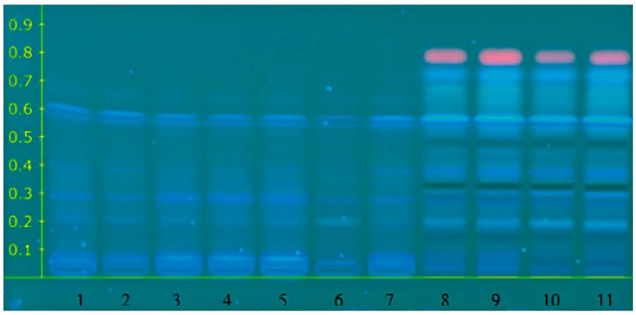


Рисунок 4. **Хроматограмма образцов 13–18 (Э) и 5,6 (М) (фотография при 366 нм).**

Примечание. Э – экстрагент этанол 70 %; М – экстрагент метанол

Figure 4. **Chromatogram of samples 13–18 (E) and 5,6 (M) (picture at 254 nm).**

Note. E – extractant ethanol 70 %; M – extractant methanol

На примере приведенных изображений (рисунки 1–4) видно, что разделение метанольных извлечений в данной системе растворителей осуществляется гораздо лучше, чем этанольных. Визуально на хроматограмме можно наблюдать большее количество пятен. Это подтверждают денситограммы треков, полученные с помощью спектроденситометра CAMAG® Scanner 3 (рисунки 5, 6). Таким образом, для проведения анализа корневищ и корней родиолы розовой гораздо целесообразнее использовать в качестве экстрагента спирт метиловый.

Сканирующую денситометрию проводили при 254 нм (рисунок 7). Сравнивали денситограммы отдельных треков между собой для того, чтобы выявить образцы с большим количеством соединений.

При визуальном сравнении треков 18 образцов корневищ и корней родиолы розовой (экстра-

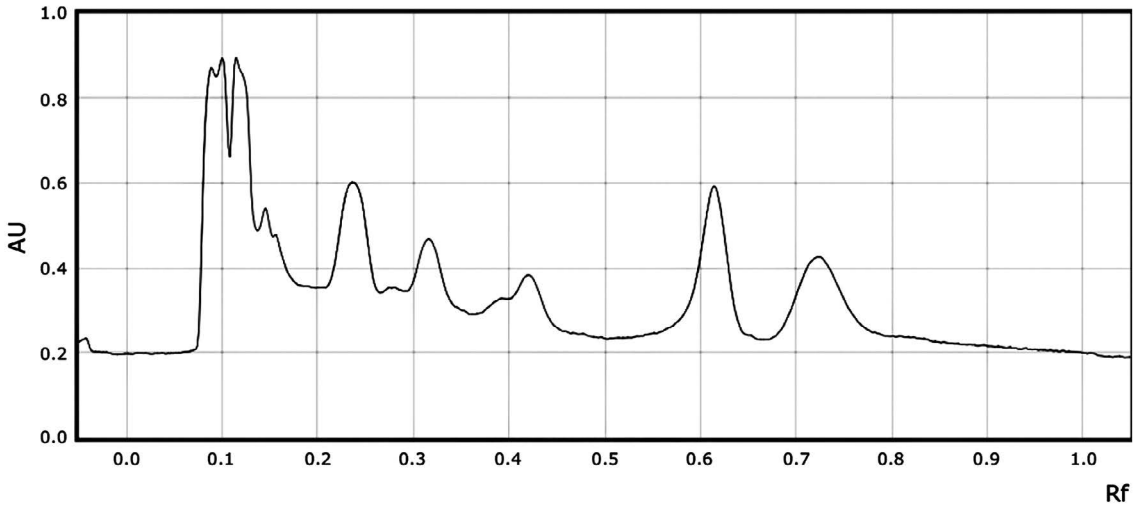


Рисунок 5. **Денситограмма трека № 2 (рисунок 3) (образец 6, экстрагент – спирт этиловый 70 %)**

Figure 5. **Densitogram of the track № 2 (figure 3) (sample 6, extractant – ethyl alcohol 70 %)**

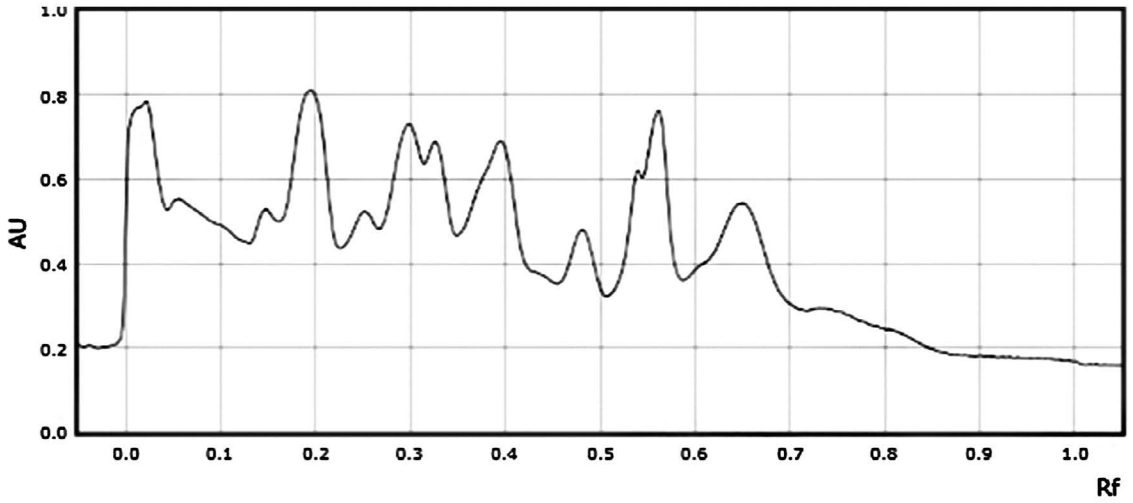


Рисунок 6. **Денситограмма трека № 11 (рисунок 4) (образец 6, экстрагент – спирт метиловый)**

Figure 6. **Densitogram of the track № 11 (figure 4) (sample 6, extractant – methyl alcohol)**

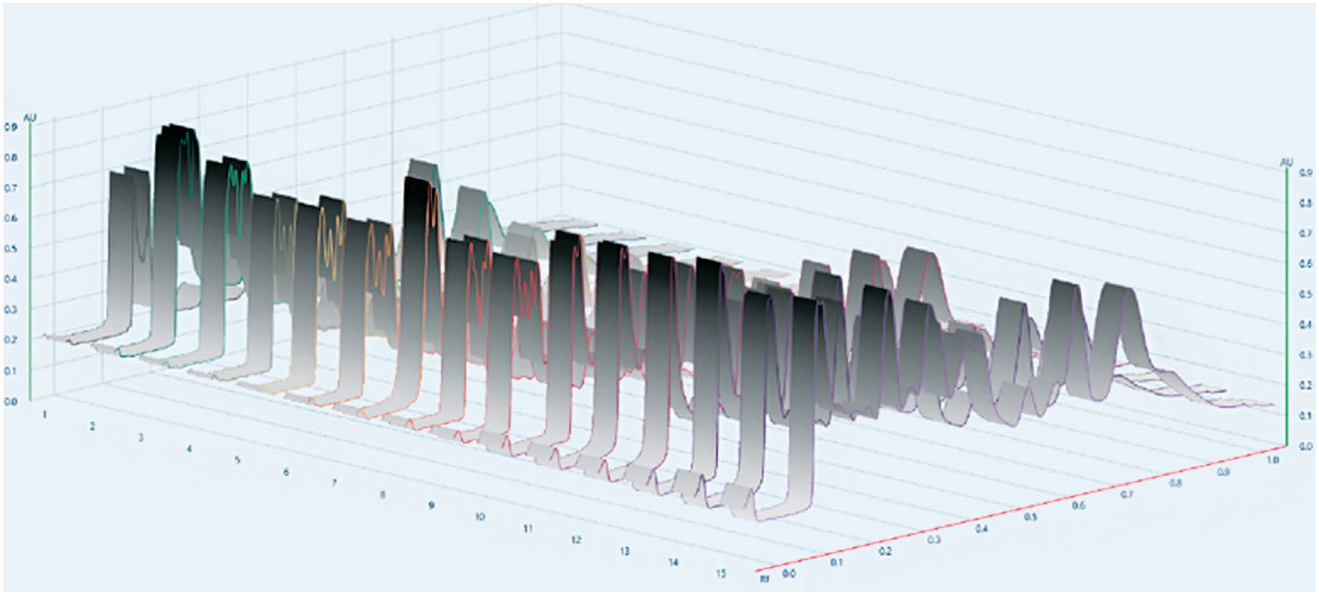


Рисунок 7. **3D денситограмма (254 нм) хроматограммы образцов 5–12**

Figure 7. **3D densitogram (254 nm) chromatograms of samples 5–12**

гент – спирт этиловый 70 %), было установлено, что перспективными для последующего исследования и культивирования являются образцы № 6, 17 (рисунки 5, 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа спиртовых извлечений из корневищ и корней родиолы розовой методом ВЭТСХ было установлено, что большим содержанием биологически активных веществ отличаются образцы 6 (Томск, Россия) и 17 (сортов Valla Di Aposta/Hirvos, страна происхождения – Италия/Финляндия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В. А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: монография. Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. 2020. 240 с.
2. Буданцев А. Л., ред. Семейства *Actinidaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae*. В кн.: Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2009. С. 168–171.
3. Amsterdam J. D., Panossian A. G. *Rhodiola rosea* L. as a putative botanical antidepressant. *Phytomedicine*. 2016;23(7):770–783. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.009.
4. Anghelescu I. G., Edwards D., Seifritz E., Kasper S. Stress management and the role of *Rhodiola rosea*: a review. *International Jour-*

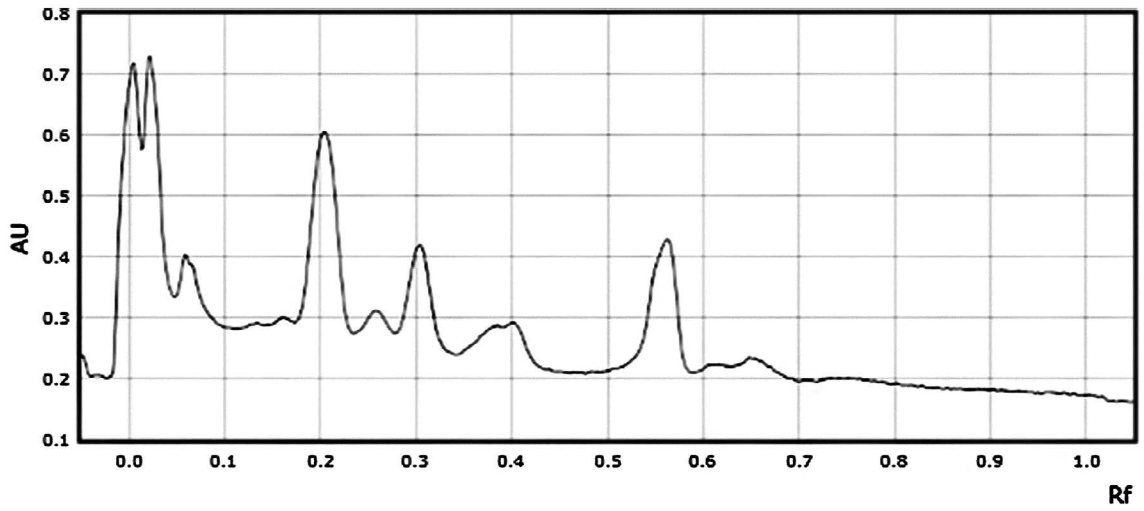


Рисунок 8. Денситограмма трека № 6 (рисунок 4) (образец 17, экстрагент – спирт этиловый 70 %)

Figure 8. Densitogram of the track № 6 (figure 4) (sample 17, extractant – ethyl alcohol 70 %)

nal of Psychiatry in Clinical Practice. 2018;22(4):242–252. DOI: 10.1080/13651501.2017.1417442.

5. Bai X. L., Deng X. L., Wu G. J., Li W. J., Jin S. *Rhodiola* and salidroside in the treatment of metabolic disorders. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2019; 19(19): 1611-1626. DOI: 10.2174/1389557519666190903115424.
6. Kosakowska O., Bączek K., Przybył J. L., Pióro-Jabrucka E., Czupa W., Synowiec A., Gniewosz M., Costa R., Mondello L., Węglarz Z. Antioxidant and Antibacterial Activity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) Dry Extracts. *Molecules*. 2018;23(7):1767. DOI: 10.3390/molecules23071767.
7. Li Y., Pham V., Bui M., Song L., Wu C., Walia A., Uchio E., Smith-Liu F., Zi X. *Rhodiola rosea* L.: an herb with anti-stress, anti-aging, and immuno-stimulating properties for cancer chemoprevention. *Current Pharmacology Reports*. 2017; 3(6):384–395. DOI: 10.1007/s40495-017-0106-1.
8. Cui Q., Du R., Anantpadma M., Schafer A., Hou L., Tian J., Davey R., Cheng H., Rong L. Identification of ellagic acid from plant *Rhodiola rosea* L. as an Anti-Ebola Virus entry inhibitor. *Viruses*. 2018;10 (4):152. DOI: 10.3390/v10040152.
9. Todorova V., Ivanov K., Delattre C., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S. Plant Adaptogens – History and Future Perspectives. *Nutrients*. 2021;13(8):2861. DOI: 10.3390/nu13082861.
10. Кукина Т. П., Щербаков Д. Н., Зыбкина А. В., Елшин И. А., Корсаков В. О., Сальникова О. И., Колосов П. В., Сандаг Ц., Каракай Д. А., Мордвинова Е. Д. Влияние экстрагента на состав липофильных компонентов экстрактов корневища *Rhodiola rosea* L. и активность экстрактов. *Химия растительного сырья*. 2021;4:307–317. DOI: 10.14258/jcprm.2021049872.
11. Куркин В. А., Рязанова Т. К. Вопросы стандартизации лекарственных препаратов родиолы розовой. Фармация *и* фармакология. 2021;9(3):185–194. DOI: 10.190163/2307-9266-2021-9-3-185-194.
12. Elameen A., Kosman V. M., Thomsen M., Pozharitskaya I. N., Shikov A. N. Variability of Major Phenyletanes and Phenylpropanoids in 16-Year-Old *Rhodiola rosea* L. Clones in Norway. *Molecules*. 2020;25(15):3463. DOI: 10.3390/molecules25153463.
13. Panossian A., Wikman G., Sarris J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*. 2010;17(7):481–493. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.02.002.
14. Marchev A. S., Ivanka K. Koycheva, Ina Y. Aneva, Milen I. Georgiev Authenticity and quality evaluation of different *Rhodiola* species and commercial products based on NMR-spectroscopy and HPLC. *Phytochemical Analysis*. 2020;31(6):756–769. DOI: 10.1002/pca.2940.
15. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Лужанин В. Г., Жохова Е. В. Использование метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии для обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):129–137. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-129-137.
16. Cañigueral S., Frommenwiler D., Reich E., Vila R. High performance thin-layer chromatography (HPTLC) in the quality control of herbal products. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2018;8:119–136.
17. Dimpfel W., Schombert L., Panossian A. G. Assessing the Quality and Potential Efficacy of Commercial Extracts of Rhodiola rosea L. by Analyzing the Salidroside and Rosavin Content and the Electrophysiological Activity in Hippocampal Long-Term Potentiation, a Synaptic Model of Memory. *Front. Pharmacol*. 2018;9:425. DOI: 10.3389/fphar.2018.00425.
18. 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.

REFERENCES

1. Kurkin V. A. *Rhodiola rosea* (golden root): standardization and development of drugs: monograph. 2nd ed., revised. and additional. Samara: LLC «Etching»; FSBEI HE Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia; 2020. 240 p. (In Russ.)
2. Budancev A. L., editor. Families *Actinidaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae*. In: Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their composition and biological activity. V. 2. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2009. P. 168–171. (In Russ.)
3. Amsterdam J. D., Panossian A. G. *Rhodiola rosea* L. as a putative botanical antidepressant. *Phytomedicine*. 2016;23(7):770–783. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.009.
4. Anghelescu I. G., Edwards D., Seifritz E., Kasper S. Stress management and the role of *Rhodiola rosea*: a review. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*. 2018;22(4):242–252. DOI: 10.1080/13651501.2017.1417442.

5. Bai X. L., Deng X. L., Wu G. J., Li W. J., Jin S. *Rhodiola* and salidroside in the treatment of metabolic disorders. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2019; 19(19): 1611-1626. DOI: 10.2174/1389557519666190903115424.
6. Kosakowska O., Bączek K., Przybył J. L., Pióro-Jabrucka E., Czupa W., Synowiec A., Gniewosz M., Costa R., Mondello L., Węglarz Z. Antioxidant and Antibacterial Activity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) Dry Extracts. *Molecules*. 2018;23(7):1767. DOI: 10.3390/molecules23071767.
7. Li Y., Pham V., Bui M., Song L., Wu C., Walia A., Uchio E., Smith-Liu F., Zi X. *Rhodiola rosea* L.: an herb with anti-stress, anti-aging, and immuno-stimulating properties for cancer chemoprevention. *Current Pharmacology Reports*. 2017; 3(6):384–395. DOI: 10.1007/s40495-017-0106-1.
8. Cui Q., Du R., Anantpadma M., Schafer A., Hou L., Tian J., Davey R., Cheng H., Rong L. Identification of ellagic acid from plant *Rhodiola rosea* L. as an Anti-Ebola Virus entry inhibitor. *Viruses*. 2018;10 (4):152. DOI: 10.3390/v10040152.
9. Todorova V., Ivanov K., Delattre C., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S. Plant Adaptogens – History and Future Perspectives. *Nutrients*. 2021;13(8):2861. DOI: 10.3390/nu13082861.
10. Kukina T. P., Shcherbakov D. N., Zybkina A. V., Elshin I. A., Korsakov V. O., Salnikova O. I., Kolosov P. V., Sandag Ts., Karakay D. A., Mordvinova E. D. Influence of extractant on the composition of lipophilic components of Rhodiola rosea L. rhizome extracts and activity of extracts. *Chemistry of plant raw materials*. 2021;4:307–317. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021049872.
11. Kurkin V. A., Ryazanova T. K. Standardization problems of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):185–194. (In Russ.) DOI: 10.190163/2307-9266-2021-9-3-185-194.
12. Elameen A., Kosman V. M., Thomsen M., Pozharitskaya I. N., Shikov A. N. Variability of Major Phenyletanes and Phenylpropanoids in 16-Year-Old *Rhodiola rosea* L. Clones in Norway. *Molecules*. 2020;25(15):3463. DOI: 10.3390/molecules25153463.
13. Panossian A., Wikman G., Sarris J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*. 2010;17(7):481–493. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.02.002.
14. Marchev A. S., Ivanka K. Koycheva, Ina Y. Aneva, Milen I. Georgiev Authenticity and quality evaluation of different *Rhodiola* species and commercial products based on NMR-spectroscopy and HPLC. *Phytochemical Analysis*. 2020;31(6):756–769. DOI: 10.1002/pca.2940.
15. 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. *Drug development & registration*. 2021;10(4):129-137. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-129-137.
16. Cañigueral S., Frommenwiler D., Reich E., Vila R. High performance thin-layer chromatography (HPTLC) in the quality control of herbal products. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2018; VIII:119-136.
17. Dimpfel W., Schombert L., Panossian A. G. Assessing the Quality and Potential Efficacy of Commercial Extracts of Rhodiola rosea L. by Analyzing the Salidroside and Rosavin Content and the Electrophysiological Activity in Hippocampal Long-Term Potentiation, a Synaptic Model of Memory. *Front. Pharmacol*. 2018; 9: 425. DOI: 10.3389/fphar.2018.00425.
18. 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.

ФАРМА УЗБЕКИСТАН И ЦЕНТРАЛЬНАЯ АЗИЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС И ВЫСТАВКА

СТРОИТЕЛЬСТВО И МОДЕРНИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЗАВОДОВ

16–18 НОЯБРЯ 2022
ТАШКЕНТ, УЗБЕКИСТАН

Генеральный спонсор: SOFTGROUP

Партнер технического визита: NIKAPHARM качество стало доступным

VOSTOCK CAPITAL — 20 лет успеха —

+7 495 109 9 509 (Москва)
events@vostockcapital.com

WWW.PHARMAUZ.COM

КЛЮЧЕВЫЕ МОМЕНТЫ В ПРОГРАММЕ КОНГРЕССА:

200+ РУКОВОДИТЕЛЕЙ КРУПНЕЙШИХ КОМПАНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ соберутся вместе на одной площадке для обсуждения наиболее острых вопросов в индустрии!

ТЕХНИЧЕСКИЙ ВИЗИТ на производство лекарственных средств в Узбекистане.

20+ ДОКЛАДОВ с уникальной информацией от руководителей ключевых компаний отрасли.

50+ КРУПНЕЙШИХ ПРОЕКТОВ ЛИДЕРОВ ИНДУСТРИИ.
Представление этапов реализации крупнейших инвестиционных проектов фармацевтической промышленности Узбекистана.

ТРЕНДЫ 2022. СТРОИТЕЛЬСТВО И МОДЕРНИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЗАВОДОВ: меры государственной поддержки, иностранные инвестиции, новые и существующие проекты.
Чем сегодня живет фармацевтическая промышленность в Узбекистане?

РАЗВИТИЕ ПРОИЗВОДСТВ.
Внедрение передовых практик при строительстве новых и модернизации старых мощностей: опыт фармацевтических компаний Узбекистана, преимущества, сложности и ключевые этапы.

СТРОИТЕЛЬСТВО.
Проекты строительства фармацевтических предприятий. Что важно учитывать в проектной документации? Какие шаги от проекта до ввода в эксплуатацию?

ТЕХНОЛОГИИ.
Как подобрать необходимое оборудование для конкретного производства? Как выбрать и определить необходимость вспомогательного оборудования? Как провести валидацию готового к эксплуатации предприятия?

CASE STUDIES.
Примеры и опыт модернизации предприятий фармацевтических компаний Узбекистана. Какие методы повышения эффективности предприятия существуют? Как выбрать подходящий метод именно для вашей компании?

ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ПЛАНИРОВКА ПОМЕЩЕНИЙ. Как правильно обеспечить промышленную безопасности на производстве? Какие требования по пожарной безопасности на производстве и как им соответствовать?

СМЕНА ПРОФИЛИРОВАНИЯ: От БАДов к лекарственным препаратам.
Опыт других компаний отрасли. Какие тонкости в регистрации, нормах производства, хранения и логистики лекарственных препаратов?

ИНВЕСТИЦИИ.
Какие существуют методы привлечения иностранных инвесторов?
Что необходимо для работы с зарубежными инвесторами?

ЭКСКЛЮЗИВНАЯ ВЫСТАВКА И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕЗЕНТАЦИИ.
Технологические презентации, роуд-шоу, специализированная выставка технологий, оборудования и услуг от мировых лидеров.

30+ ЧАСОВ ДЕЛОВОГО И НЕФОРМАЛЬНОГО ОБЩЕНИЯ!
Встречи один на один, деловые обеды, кофе-брейки, коктейльный прием и многое другое.

ЧЕМ СЕГОДНЯ ЖИВЕТ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ В УЗБЕКИСТАНЕ?

СРЕДИ ПОДТВЕРЖДЕННЫХ УЧАСТНИКОВ:

Biocom · belpharm Effectiveness and quality accessible · Dora Line Pharmaceutical Company · farmaprim · Malika laboratories · MERRYMED FARM · novatio tabiiy zo'r · Paradise Pharm · RMF · tibtexnika · UGP UZGERMED PHARM · samo · WELL MED PHARM Born to care & cure · NOBEL · ROSSA

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-181-194
УДК 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Скрининг липофильных фракций ботанических форм Сельдерея пахучего методом ГХ/МС

Е. С. Сурбеева✉, Н. Ю. Сипкина, С. И. Комова, У. А. Ефремова, И. И. Тернинко

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14А

✉ **Контактное лицо:** Сурбеева Елизавета Сергеевна. **E-mail:** bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

ORCID: Е. С. Сурбеева – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477; Н. Ю. Сипкина – https://orcid.org/0000-0001-7501-8254;
С. И. Комова – https://orcid.org/0000-0002-4484-6265; У. А. Ефремова – https://orcid.org/0000-0001-5144-3061; И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 17.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Поиск новых средств для лечения и профилактики ожирения – социально-значимого заболевания, характеризующегося высокой распространенностью и наличием ряда осложнений – является актуальным направлением исследований. Данные литературы свидетельствуют о наличии фармакологической активности у разных групп БАВ растительного происхождения – флавоноидов, фенольных кислот, фитостеролов и т. д. в отношении ожирения и ассоциированных с ним заболеваний. Ввиду значительного накопления целевых групп соединений, а также наличия большой и возобновляемой сырьевой базы, сельдерей пахучий был выбран для исследования как потенциальный сырьевой источник БАВ, способствующих регуляции метаболических нарушений.

Цель. Изучение компонентного состава липофильных фракций ботанических форм сельдерея пахучего методом ГХ/МС и прогнозирование фармакологической активности идентифицированных соединений в рамках целевой группы патологий с использованием веб-ресурса PASS Online.

Материалы и методы. Липофильные фракции получали путем экстрагирования сухого измельченного сырья корнеплодов, черешков и листьев сельдерея пахучего хлороформом в аппарате Сокслета. Полученные извлечения анализировали на хромато-масс-спектрометре газовом Clarus 600T, (PerkinElmer, США) на базе парка оборудования ЦКП «Аналитический центр». Интерпретацию масс-спектров пиков на хроматограммах проводили с использованием библиотеки NIST-14, для дальнейшего прогнозирования биологической активности идентифицируемых соединений использовали веб-ресурс PASS Online.

Результаты и обсуждения. Состав липофильных фракций ботанических форм сельдерея представлен терпенами, бензофуранами, кумаринами, жирными кислотами и их производными, фитостеролами. Всего в извлечениях из корнеплодов было обнаружено 50 соединений, из которых идентифицировано – 68 %, черешков – 36 и 61 %; листьев – 22 и 64 % соответственно. Прогнозирование фармакологической активности индивидуальных соединений сельдерея показало возможность их использования для регуляции метаболизма липидов и углеводов, кардиоваскулярных нарушений, заболеваний печени, что подтверждает перспективность исследования.

Заключение. Результаты исследования показали, что корнеплоды и черешки сельдерея являются источником терпенов, кумаринов и производных бензофурана, кроме того, надземная часть растения демонстрирует высокое накопление фитостеролов, которые могут обладать активностью в отношении регуляции метаболизма и использоваться в комплексной терапии и профилактике ожирения.

Ключевые слова: сельдерей пахучий, ботанические формы, липофильная фракция, ГХ/МС, PASS Online, коррекция метаболических нарушений

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

Вклад авторов. Е. С. Сурбеева отвечала за выполнение отдельных разделов эксперимента, обработку, интерпретацию полученных данных и формулирование выводов. Н. Ю. Сипкина сделала анализ хлороформных извлечений методом ГХ/МС, редактирование рукописи. С. И. Комова и У. А. Ефремова осуществили пропободготовку и участие в интерпретации данных хроматограмм. И. И. Тернинко принадлежит идея и планирование дизайна эксперимента, редактирование 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: Сурбеева Е. С., Сипкина Н. Ю., Комова С. И., Ефремова У. А., Тернинко И. И. Скрининг липофильных фракций ботанических форм сельдерея пахучего методом ГХ/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(3):181–194. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-181-194

Screening of Lipophilic Fractions of Botanical Forms of Celery by GC/MS Method

Elizaveta S. Surbeeva✉, Nadezhda Y. Sipkina, Sophia I. Komova, Ulyana A. Efremova, Inna I. Terninko

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Elizaveta S. Surbeeva. **E-mail:** bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

© Сурбеева Е. С., Сипкина Н. Ю., Комова С. И., Ефремова У. А., Тернинко И. И., 2022
© Surbeeva E. S., Sipkina N. Y., Komova S. I., Efremova U. A., Terninko I. I., 2022

ORCID: Elizaveta S. Surbeeva – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477; Nadezhda Y. Sipkina – https://orcid.org/0000-0001-7501-8254;
Sophia I. Komova – https://orcid.org/0000-0002-4484-6265; Ulyana A. Efremova – https://orcid.org/0000-0001-5144-3061; Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 17.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The search for new tools for the treatment and prevention of obesity – a socially significant disease characterized by high prevalence and the presence of a number of complications – is an urgent area of research. Literature data indicate the presence of pharmacological activity in different groups of BAC of plant origin – flavonoids, phenolic acids, phytosterols, etc. in relation to obesity and its associated diseases. In view of the significant accumulation of target groups of compounds, as well as the availability of a large and renewable raw material base, celery was chosen for research as a potential raw source of BAC contributing to the regulation of metabolic disorders.

Aim. To investigate the component composition of lipophilic fractions of botanical forms of celery by GC/MS and to predict the pharmacological activity of identified compounds within the target group of pathologies using the web resource PASS Online.

Materials and methods. Lipophilic fractions were prepared by chloroform extraction of dry crushed raw material of celery root, stalks and leaves in a Soxhlet apparatus. Obtained extracts were analyzed on gas chromatography-mass spectrometer "Clarus 600T" (PerkinElmer, USA) on the basis of the Collaborative Centre "Analytical Center" equipment. Interpretation of the mass spectra of the peaks on the chromatograms was carried out using the NIST-14 library, for further prediction of biological activity of the identified compounds we used web-resource PASS Online.

Results and discussion. The composition of lipophilic fractions of celery botanical forms is represented by terpenes, benzofurans, coumarins, fatty acids and their derivatives, phytosterols. A total of 50 compounds were found in extracts from celery root, of which 68 % were identified, stalks – 36 and 61 %; leaves – 22 and 64 %, respectively. Prediction of the pharmacological activity of individual compounds of celery showed the possibility of their use for the regulation of lipid and carbohydrate metabolism, cardiovascular disorders and liver diseases, which confirms the prospects of this study.

Conclusion. The results have shown that celery roots and stalks are a source of terpenes, coumarins and benzofuran derivatives, in addition, the above-ground part of the plant shows high accumulation of phytosterols, which may have metabolic regulation activity and be used in the complex therapy and prevention of obesity.

Keywords: celery, botanical forms, lipophilic fraction, GC/MS, PASS Online, correction of metabolic disorders

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. Elizaveta S. Surbeeva performed experimental work, obtaining and processing data, formulating conclusions and writing an article. Nadezhda Yu. Sipkina analyzed chloroform extracts by GC/MS, editing the manuscript. Sophia I. Komova and Ulyana A. Efremova carried out the preparation and participation in the interpretation of chromatogram data. Inna I. Terninko owns the idea and planning of the design of the experiment, editing the manuscript.

Funding. The results were obtained using the equipment of CCU "Analytical Center of SPCFU of the Ministry of Health of Russia" under Agreement № 075-15-2021-685 of July 26, 2021 under the financial support of the Russian Ministry of Education and Science.

For citation: Surbeeva E. S., Sipkina N. Y., Komova S. I., Efremova U. A., Terninko I. I. Screening of lipophilic fractions of botanical forms of celery by GC/MS method. *Drug development & registration*. 2022;11(3):181–194. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-181-194

ВВЕДЕНИЕ

Метаболический синдром, ожирение и ассоциированные с ним заболевания являются высоко значащей социальной группой патологий как на уровне Российской Федерации, так и в мировом масштабе[1] [1–2]. Согласно данным ВОЗ, на 2016 год 39 % населения имели избыточную массу тела, а 13 % – ожирение. Согласно клиническим рекомендациям [3], избыточное накопление жировой ткани в организме сопровождается ее хроническим воспалением, а также служит фактором риска для развития нарушений со стороны работы различных органов и систем. В частности, ожирение способствует развитию сахарного диабета 2 типа, кардиоваскулярных заболеваний (в первую очередь артериальной гипертензии), нарушений липидного обмена, неалкогольной жировой болезни печени, гиперурикемии, расстройств желудочно-кишечного тракта, гормональных сбоев, депрессивных симптомов и остеохондроза.

Высокая распространнность избыточного веса, а также наличие большого перечня заболеваний, ассоциированных с накоплением жира в организме, делает актуальным поиск новых средств для лечения и профилактики данной группы патологий. Важно отметить, что в последние годы наблюдается высокая приверженность пациентов к фитотерапии[2], применение которой характеризуется относительной безопасностью, эффективностью и экономичностью.

Несмотря на отсутствие показаний к применению растительных препаратов в клинических рекомендациях, данные литературы говорят о наличии фармакологической активности у различных групп БАВ

[1] Всемирная организация здравоохранения. Ожирение и избыточный вес. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. Ссылка активна на 20.04.2022.

[2] Всемирная организация здравоохранения. Стратегия ВОЗ в области народной медицины 2014–2023 гг. Доступно по: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789244506097_rus.pdf. Ссылка активна на 20.04.2022.

растительного происхождения, включая фенольные соединения [4–8], полисахариды [9], фитостеролы [10], терпены [11] и алкалоиды [12, 13] в отношении регуляции углеводного и липидного метаболизма, снижения массы тела и гепатопротекторной активности.

Apium graveolens L. – двулетняя пищевая культура семейства *Apiaceae*, имеющая значительную и возобновляемую сырьевую базу. Сельдерей пахучий представлен 3 ботаническими формами – корневой, черешковой и листовой, которые характеризуются высоким накоплением различных групп БАВ, включая фенольные соединения, полисахариды, эфирное масло, жирные кислоты и др. [14]. При этом данные литературы говорят о положительном влиянии экстракта на основе листьев сельдерея [15] на лечение ожирения в рамках доклинических испытаний. В связи с большим сырьевым запасом и высоким фитохимическим потенциалом сельдерея пахучего, данное растение было выбрано нами как потенциальное сырье для поиска таргетных соединений, способствующего регуляции метаболизма.

Цель данной работы – изучить компонентный состав липофильных фракций корнеплодов, черешков и листьев сельдерея пахучего методом ГХ/МС с использованием библиотеки масс-спектров NIST и провести прогнозирование фармакологической активности идентифицированных соединений в рамках целевой группы патологий – ожирения и ассоциированных с ним заболеваний – с использованием веб-ресурса PASS Online.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали корнеплоды, черешки и листья сельдерея пахучего. Корнеплоды и черешки приобретали в сети продуктовых маркетов г. Санкт-Петербурга, по информации на упаковке, корнеплоды: сорт «Каскаде», страна происхождения Россия, 2021 г. заготовки; стебли (черешки): сорт «Малахит», страна происхождения Израиль, 2022 г. заготовки. Листья заготавливали на базе питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ М3 РФ в Ленинградской области, поселок Лемболово, в августе-сентябре 2021 года. Сырье высушивали методом воздушно-теневой сушки, раскладывая тонким слоем. Корнеплоды и стебли предварительно разрезали на куски примерно 5 × 5 см.

Липофильные фракции ботанических форм сельдерея получали путем экстракции сырья хлороформом на аппарате Сокслета (соотношение сырье:экстрагент – 1:5) в течении часа. Хлороформные извлечения из листьев, черешков и корнеплодов сельдерея анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) в режиме сканирования полного тока.

Условия хроматографирования: газовый хромато-масс-спектрометр – Clarus 600T, (PerkinElmer, США); хроматографическая колонка – Rtx-5MS, 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм; газ-носитель – гелий; температура инжектора – 250 °С; программирование температур термостата колонки: 0–1 мин – 50 °С; 2–51 мин – увеличение температуры со скоростью 4 °С/мин до 250 °С; 52–55 мин – выдерживание при 250 °С; скорость потока газа-носителя – 1 мл/мин; объем вводимой пробы – 0,5 мкл; общее время записи хроматограммы – 60 минут [16].

Масс-спектрометр: электронная ионизация (EI) при 70 eV; квадрупольный анализатор-масс; диапазон m/z 29–350; температура линии переноса – 250 °С; температура детектора – 240 °С. Интерпретацию масс-спектров осуществляли с помощью библиотеки NIST-14. Оценку количественного содержания компонентов липофильных фракций проводили методом внутренней нормализации.

После интерпретации масс-спектров пиков хроматограмм, осуществляли прогностическую оценку фармакологической активности идентифицированных соединений с использованием программы PASS Online [2]. При изучении каждого вида активности оценивали вероятностей наличия (Pa) и отсутствия (Pi) ее проявления.

Исследование 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 Министерства образования и науки России.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматограммы липофильных фракций корнеплодов, черешков и листьев сельдерея представлены на рисунках 1–3. Всего в извлечении из корнеплодов было обнаружено 50, в черешках – 36 и в листьях – 22 соединения из которых идентифицировано 34 (68 %), 22 (61 %) и 14 (64 %) соответственно. Характеристика идентифицированных соединений в сравнительном аспекте по ботаническим формам представлена в таблице 1 и на диаграмме (рисунок 4), которая демонстрирует соотношение групп БАВ в анализируемых извлечениях в сравнительном аспекте.

Данные рисунка 4 и таблицы 1 демонстрируют превалирование липофильных соединений в корневой ботанической форме сельдерея. При этом необходимо отметить, что несмотря на различный количественный состав компонентов, доля идентифицированных соединений в различных формах сельдерея одинакова. Корнеплоды также характеризуются большим разнообразием и накоплением кумаринов (около 2,5 %) и производных бензофурана относительно других ботанических форм. При этом в сумме соединений кумариновой природы превалируют фуранокумарины, а общим для корнеплодов и черешков является только бергаптен.

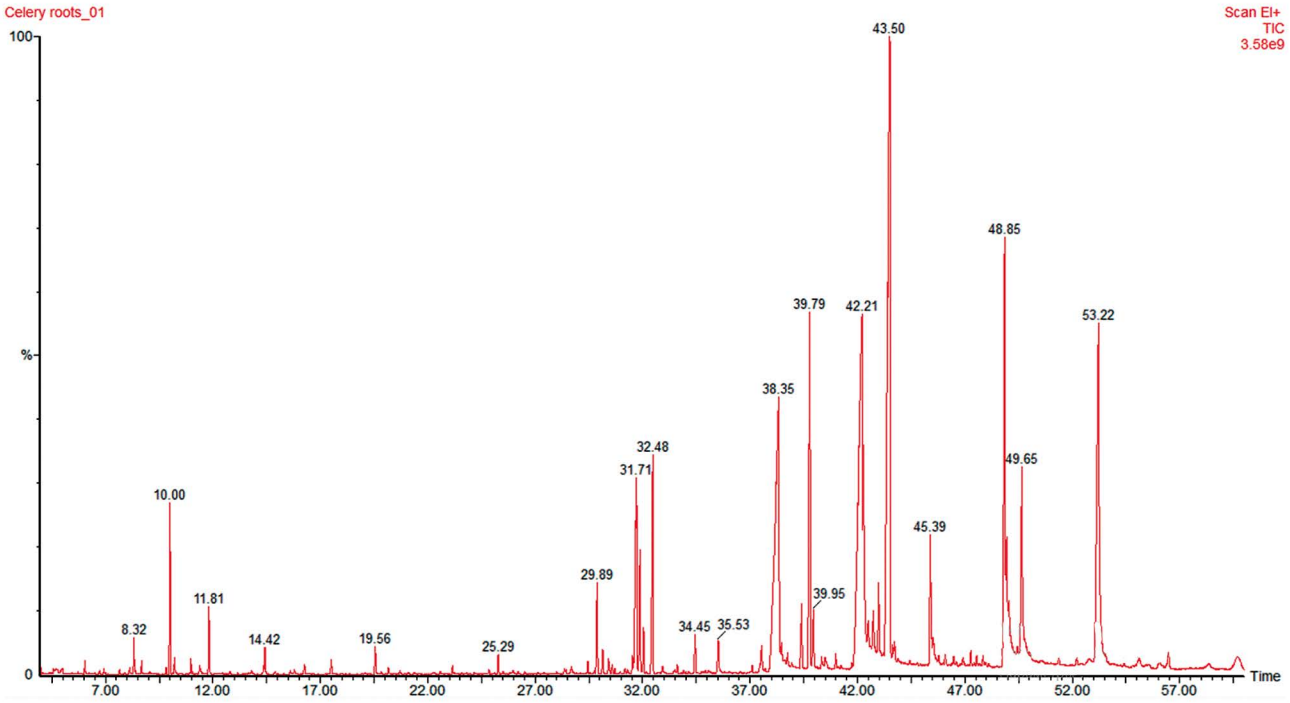


Рисунок 1. **Хроматограмма липофильной фракции сельдерея корневого**

Figure 1. **Chromatogram of the lipophilic fraction of celery root**

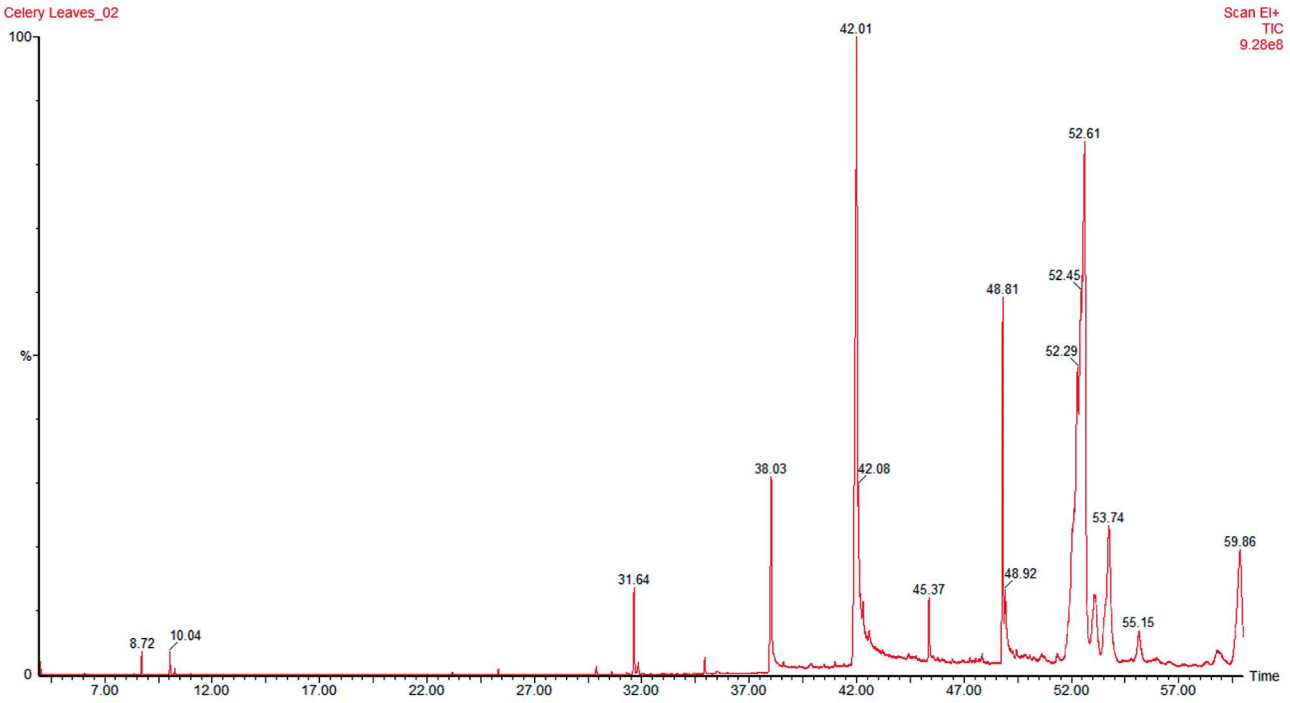


Рисунок 2. **Хроматограмма липофильной фракции сельдерея листового**

Figure 2. **Chromatogram of the lipophilic fraction of leaf celery**

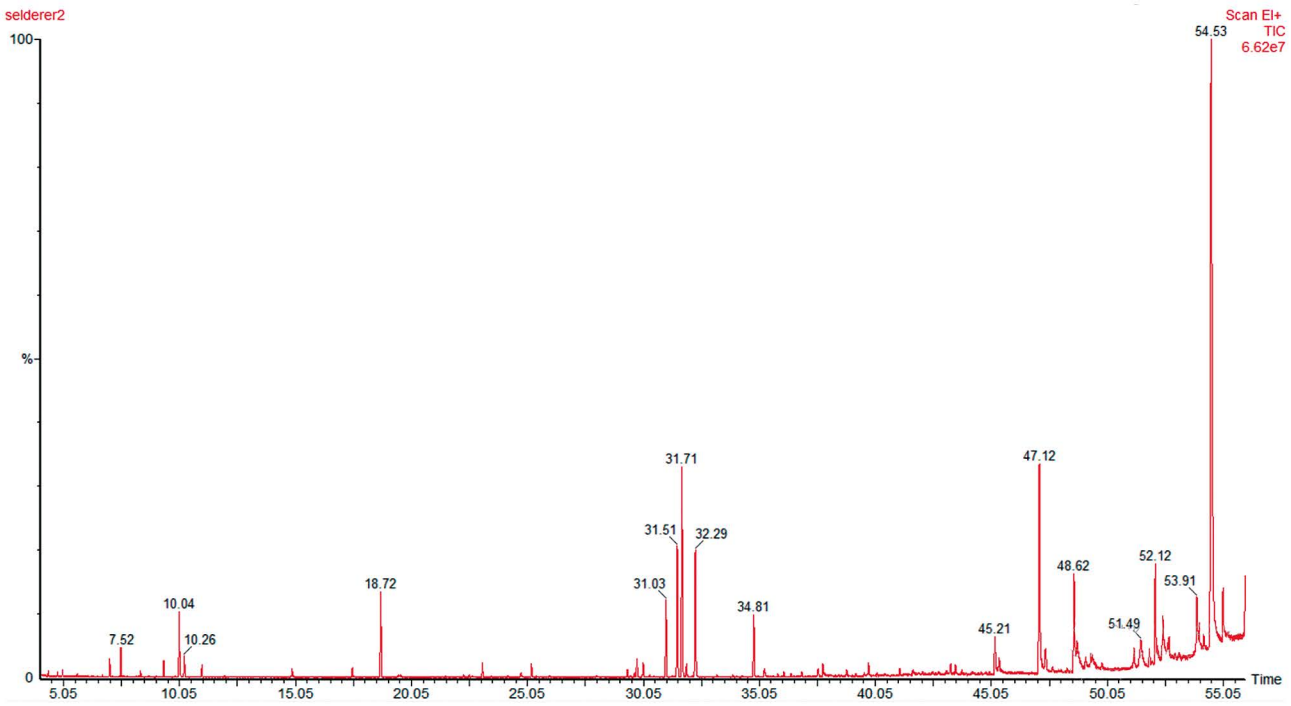


Рисунок 3. **Хроматограмма липофильной фракции сельдерея черешкового**

Figure 3. **Chromatogram of the lipophilic fraction of stalks celery**

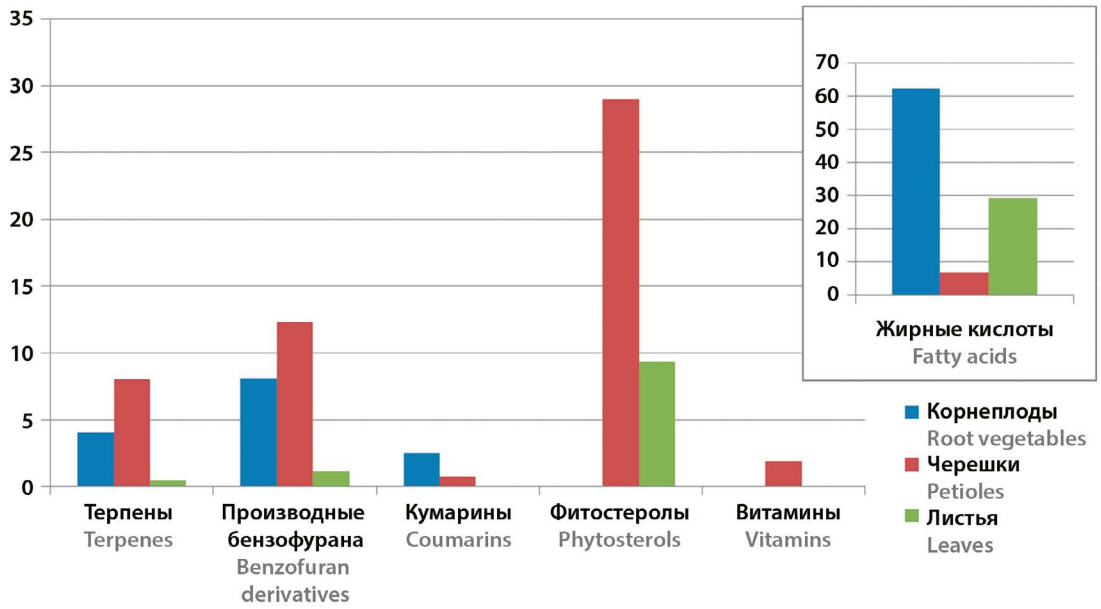


Рисунок 4. **Сравнительное содержание групп БАВ (%) в хлороформных извлечениях ботанических форм сельдерея пахучего**

Figure 4. **Comparative content of BAS groups (%) in chloroform extracts of botanical forms of odorous celery**

Однако если в случае кумаринов их накопление превалирует в корнеплодах, то наибольшая концентрация бензофуранов (около 12 %) наблюдается у черешковой ботанической формы. Данная группа БАВ обуславливает специфический запах сырья сельдерея. Обе ботанические формы демонстрируют широкий профиль терпенов, но в данном случае и качественные, и количественные характеристики этой группы БАВ превалируют в черешках. Листья характеризуются минорным накоплением терпенов и производных бензофурана, а кумарины в данной ботанической форме не были идентифицированы.

Таблица 1. Идентифицированные соединения липофильной фракции ботанических форм сельдерея

Table 1. Identified compounds of the lipophilic fraction of the botanical forms of celery

Наименование идентифицируемого вещества Name of identified substance	Корнеплоды Roots		Черешки Stalks		Листья Leafs	
	t_R	%	t_R	%	t_R	%
Терпены *Terpenes*						
α-Туйон α-Thujene	–	–	7,04	0,31	–	–
Камфен Camphene	–	–	7,52	0,53	–	–
β-пинен β-Pinene	8,32	0,32	–	–	–	–
β-Мирцен β-Myrcene	8,68	≤0,12	8,37	≤0,35	8,72	0,16
3-Карен 3-Carene	–	–	9,37	0,32	–	–
D-Лимонен D-Limonene	10,04	1,37	10,00	1,41	10,04	0,18
Транс-α-оцимен Trans-α-Ocimene	10,21	0,14	–	–	–	–
Транс-β-осимен Trans-β-Ocimene	–	–	–	–	10,25	≤0,15
α-Пинен α-Pinene	–	–	10,26	0,38	–	–
γ-Терпинен γ-Terpinene	10,97	0,13	11,02	≤0,35	–	–
5-Пентилциклогекса-1,3-диен 5-Pentylcyclohexa-1,3-diene	14,42	0,26	–	–	–	–
Эндо-борнеол Endo-Borneol	–	–	14,9	≤0,35	–	–
Изоборнеола ацетат Isobornyl acetate	–	–	18,72	1,94	–	–
Транс-кариофиллен Trans-Caryophyllen	23,15	≤0,12	23,11	0,29	–	–
β-Селинен β-Selinene	25,29	0,20	25,23	≤0,35	–	–
Фитол Phytol	–	–	34,81	1,44	–	–
Сквален Squalene	56,47	**2,28**	–	–	–	–
Производные бензофурана *Benzofuran derivatives*						
Гексагидро-3-бутилфталид Hexahydro-3-butulphthalide	29,42	0,13	–	–	–	–
Бутилфталид Butulphthalide	29,89	1,02	–	–	29,88	≤0,15
Бутилиденфталид Butulidenephthalide	30,41	0,19	–	–	–	–
Сенкиунолид Senkyunolide	31,71	**3,39**	31,51	**3,32**	31,64	0,88
3-Изобутилиденфталид 3-Isobutylidenphthalide	–	–	31,71	**5,61**	–	–
Транс-седанолид Trans-Sedanolide	–	–	32,29	**3,39**	31,84	≤0,15
Транс-лигустилид Trans-Ligustilide	32,04	0,44	–	–	–	–
Изокнидилид Isocnidilide	32,48	**2,94**	–	–	–	–
Кумарины (в т. ч. фуранокумарины) *Coumarins (including furanocoumarins)*						
Фикусин Ficusin	34,45	0,46	–	–	–	–
Скополетин Scopoletin	37,55	0,49	–	–	–	–

Окончание таблицы 1

Наименование идентифицируемого вещества Name of identified substance	**Корнеплоды** Roots		**Черешки** Stalks		**Листья** Leafs	
	t_R	%	t_R	%	t_R	%
Метоксален Methoxsalen	39,40	0,83	–	–	–	–
Бергаптен Bergapten	39,95	0,75	39,76	0,38	–	–
Изопимпинелин Isopimpinellin	–	–	43,51	≤0,35	–	–
Жирные кислоты и их производные (спирты, эфиры) Fatty acids and their derivatives (alcohols, esters)						
Н-пентадекановая кислота Pentadecanoic acid	35,53	3,31	–	–	–	–
Пальмитиновая кислота Palmitinic acid	**38,35**	**11,04**	37,79	0,38	38,03	3,31
Фалькаринол Falcarinol	39,79	4,26	–	–	–	–
Линолевая кислота Linoleic acid	**42,21**	**12,28**	–	–	42,01	18,87
Стеариновая кислота Stearic acid	42,74	0,54	–	–	–	–
Панксидол Panaxydol	**43,39**	**15,86**	–	–	–	–
Глициридил пальмитат Glycidyl palmitate	43,50	1,79	–	–	45,37	0,83
Гександиовой кислоты моно(2-этилгексиловый) эфир Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	–	–	47,12	6,42	–	–
Этиллеоленат Ethyl linoleate	–	–	–	–	48,81	4,37
Метиллеоленат Methyl linoleate	–	–	–	–	48,92	1,96
2-Монопальмитин 2-Monopalmitin	49,65	3,41	–	–	–	–
β-Монолинолеин β-Monolinolein	53,22	9,92	–	–	–	–
Фитостеролы Phytosterols						
Стигмастерол Stigmasterol	–	–	54,53	**28,95**	53,08	**2,60**
Изофусостерол Isofucosterol	–	–	–	–	53,74	**6,94**
Витамины Vitamins						
α-Токоферол α-Tocopherol	–	–	51,49	1,92	–	–

Примечание. «–» – соединение не идентифицировано; мажоритарные соединения выделены полужирным шрифтом.

Note. "–" – connection is not identified; majority connections are in bold.

Соединения группы фитостеролов присутствуют только в надземных частях растения, причем их концентрация достаточно высокая, особенно у черешковой ботанической формы. В диапазоне 50–60 минуты на хроматограммах липофильных фракций черешков и листьев был обнаружен комплекс соединений стероидной природы, среди которых были идентифицированы стигмастерол и изофусостерол.

У всех ботанических форм сельдерея наблюдалось высокое накопление жирных кислот и их производных, что характерно для липофильных фракций растительных объектов. При этом максимальное содержание данной группы БАВ наблюдается у корнеплодов сельдерея, что обуславливается накопительной функцией данного морфологического органа.

Как видно из таблицы 1, разные ботанические формы сельдерея характеризуются различным липофильным профилем. Так, для корнеплодов сельдерея в качестве маркерных соединений можно выделить сквален (2,28 %), сенкиунолид (3,39 %) и изокнидилид (2,94 %), для черешков – стигмастерол (28,95 %), 3-изобутилиденфталид (5,61 %), сенкиунолид (3,32 %) и транс-седанолид (3,39 %), для листьев – изофусостерол (6,94) и стигмастерол (2,60 %). Таким образом, можно говорить о том, что разные ботанические формы сельдерея пахучего практически не имеют общих маркерных соединений и их профилирование индивидуально, что может свидетельствовать о биосинтетических особенностях отдельных классов фенольных соединений, в частности кумаринов и бензовуранов, и их избирательной локализации. Это позволяет позиционировать ботанические виды сельдерея как разное сырье, имеющие специфический химический состав и способное обладать разными фармакологическими свойствами.

Результаты прогнозирования биологической активности идентифицируемых соединений в рамках целевой группы патологий (ожирение и ассоциированные с ним заболевания) представлены в таблицах 2–6. Для установления взаимосвязи структура-действие, рассматриваемые вещества были разделены по классам соединений. Биологическая активность веществ рассматривалась от значения вероятности проявления Pa > 0,7.

Данные таблицы 2 показывают, что для веществ терпеновой природы характерно влияние на жировой обмен – большая часть соединений ингибирует фермент ацетил-КоА-карбоксилазы, который является ключевым в синтезе жирных кислот, а для фитола и сквалена наблюдается непосредственно регуляторная функция в отношении метаболизма липидов. Кроме того, некоторые анализируемые соединения ингибируют активность сахаро-фосфатазы – фермента, включенного в метаболизм углеводов. Вазопротекторные свойства идентифицируемых веществ позволяют позиционировать их как возможные средства для лечения пациентов с сердечно-сосудистыми коморбидными заболеваниями. Наличие противовоспалительной активности, включая ингибирование экспрессии фактора некроза опухоли и простогландинов, также можно рассматривать как целевую фармакологическую активность, которая может нивелировать хроническое воспаление жировой ткани при ожирении.

Особое внимание обращает на себя сквален ввиду относительно большого накопления в корнеплодной липофильной фракции (2,28 %) и наличия перечня активностей в отношении регуляции метаболизма липидов, углеводов, сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных нарушений, а также противовоспалительных свойств.

Производные бутилфталида, исходя из данных таблицы 3, можно рассматривать в первую очередь как потенциальные регуляторы метаболизма углеводов ввиду способности ингибировать сахарофосфатазу.

Как видно из данных таблицы 4, биологическая активность в рамках целевой группы патологий с вероятностью проявления Pa > 0,7 характерна из всех идентифицируемых кумаринов только для скополетина и только в отношении регуляции сердечно-сосудистой системы.

Соединения стероидной природы показали себя как целевая группа БАВ липофильных фракций листьев и черешков сельдерея ввиду их большого накопления (более 28 % в черешках и более 9 % в листьях сельдерея) и наличия антигиперхолестеринемической и гиполипидемической активностей с высокой вероятностью их проявления. Кроме того, для изофусостерола возможна гепатопротекторная активность, что является важным фактором в терапии коморбидных пациентов. Эти данные обуславливают актуальность целенаправленного изучения профиля фитостеролов в черешках и листьях сельдерея.

Токоферол, идентифицированный в черешках сельдерея также вносит свой вклад в регуляцию метаболизма углеводов и липидов.

Важно отметить, что при снижении предела вероятности проявления активностей (Pa) с 0,7 до 0,4 наблюдается значительное расширение видов биологического действия для идентифицированный соединений (в частности, кумаринов и фуранокумаринов), где уменьшение предела вероятности продемонстрировало увеличение ряда потенциальных БАВ-регуляторов метаболизма. Это говорит о том, что данные виды фармакологической активности не достаточно изучены для рассматриваемых соединений и обуславливает актуальность проведения дальнейших исследований.

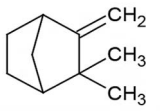
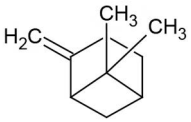
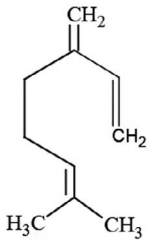
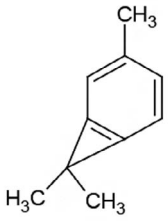
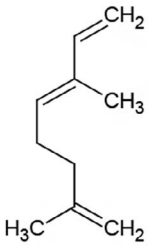
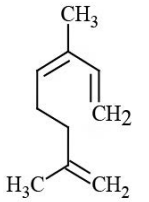
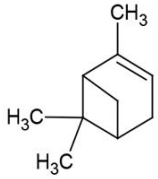
Таким образом, прогностическая оценка фармакологической активности идентифицируемых соединений охватывает широкий перечень патологий, связанных с ожирением: регуляцию липидного и углеводного обменов, противовоспалительное действие, гепатопротекторные и кардиопротекторные свойства, что подтверждает вектор исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хлороформные извлечения, представляющие собой липофильную фракцию, выделенные из трех ботанических форм сельдерея пахучего – корневого, черешкового и листового – были проанализированы методом ГХ/МС. На хроматограммах наблюдалось наличие пиков около 50 соединений в корнеплодах, 36 и 22 в черешках и листьях соответственно. С использованием библиотеки масс-спектров NIST-14 было идентифицировано более 60 % веществ, относящихся к классам терпенов, производных бензофурана, жирных кислот, кумаринов, фитостеролов и витаминов.

Таблица 2. Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса терпенов с использованием PASS Online

Table 2. Prediction of the pharmacological activity of identified compounds of the terpene class using PASS Online

Название вещества Substance name	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	Pa	Pi
Камфен Camphene		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,816	0,004
2-β-пинен 2-β-pinene		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,758	0,005
		Антагонист простогландина E1 Prostaglandin E1 antagonist	0,754	0,002
β-Мирцен β-Myrcene		Ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor	0,910	0,002
		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,743	0,025
3-карен 3-Carene		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,803	0,016
		Вазопротектор Vasoprotector	0,786	0,005
Транс-α-оцимен Trans-α-Ocimene		Ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor	0,91	0,002
Транс-β-оцимен Trans-β-Ocimene		Ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor	0,91	0,002
α-Пинен α-Pinene		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,821	0,004
		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,654	0,043

Окончание таблицы 2

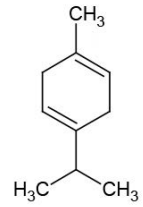
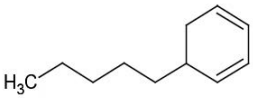
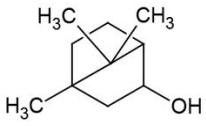
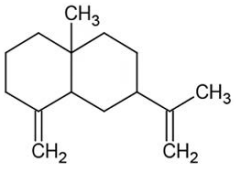
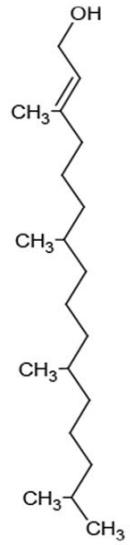
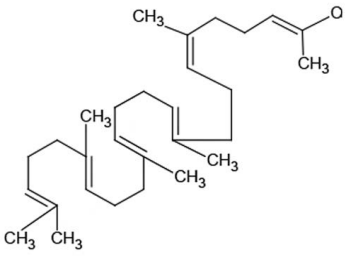
Название вещества **Substance name**	**Структурная формула** **Structural formula**	**Активность** **Activity**	**Pa**	**Pi**
γ-Терпинен γ-Terpinene		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,756	0,023
		Ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor	0,703	0,012
5-Пентилциклогекса-1,3-диен 5-Pentylcyclohexa-1,3-diene		Вазопротектор Vasoprotector	0,704	0,010
Эндо-борнеол Endo-borneol		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,875	0,004
		Вазопротектор Vasoprotector	0,828	0,004
β-Селинен β-Selinene		Противовоспалительная активность Antiinflammatory	0,764	0,009
Фитол Phytol		Регулятор липидного метаболизма Lipid metabolism regulator	0,828	0,005
		Ингибитор экспрессии фактора некроза опухоли TNF expression inhibitor	0,738	0,005
β-Селинен β-Selinene		Ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor	0,874	0,003
		Регулятор липидного метаболизма Lipid metabolism regulator	0,800	0,005
		Ингибитор экспрессии фактора некроза опухоли TNF expression inhibitor	0,753	0,004
		Ингибитор гастрина Gastrin inhibitor	0,743	0,003
		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,723	0,006

Таблица 3. Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса производных бутилфталида с использованием PASS Online

Table 3. Prediction of the pharmacological activity of the identified compounds of the class of butylphthalide derivatives using PASS Online

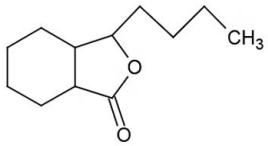
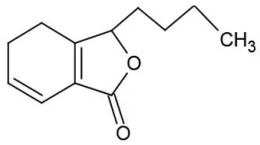
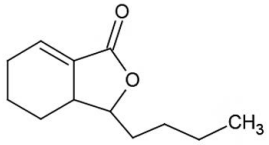
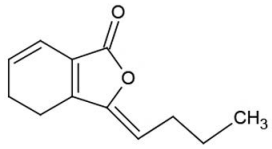
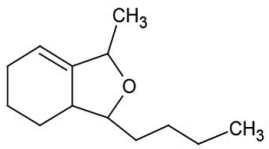
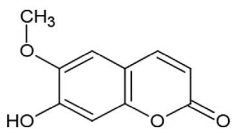
Название вещества Substance name	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	Pa	Pi
Гексагидро-3-бутилфталид Hexahydro-3-butulphthalide		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,786	0,018
		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,721	0,006
		Вазопротектор Vasoprotector	0,714	0,010
Сенкиунолид Senkyunolide		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,804	0.016
Транс-седанолид trans-Sedanolide		Противовоспалительная активность Antiinflammatory	0,717	0,014
		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,727	0,028
Транс-лигустилид Trans-Sedanolide		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,717	0,030
Изокнидилид Isocnidilide		Противовоспалительная активность Antiinflammatory	0,793	0,007
		Игнибитор сахаро-фосфатазы Sugar-phosphatase inhibitor	0,709	0,032

Таблица 4. Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса кумарины с использованием PASS Online

Table 4. Prediction of the pharmacological activity of identified compounds of the coumarin class using PASS Online

Название вещества Substance name	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	Pa	Pi
Скополетин Scopoletin		Кардиоваскулярный аналептик Cardiovascular analeptic	0,890	0,003
		Вазопротектор Vasoprotector	0,747	0,008

Наибольшее количество соединений характерно для корнеплодов сельдерея, что обуславливается накопительной функцией данного органа – более 62 % состава представлено жирными кислотами и их производными. Однако корнеплоды также можно рассматривать как потенциальный источник фталидов, кумаринов и терпенов ввиду их значительного накопления. Тем не менее, разнообразие качественного и количественного состава веществ терпеновой природы превалирует в черешках сельдерея, что позволяет позиционировать данную ботаническую форму для выделения эфирного масла и получения липофильных фракций в качестве отдельной фармацевтической субстанции растительного происхождения. Надземные части растения – стебли и листья – показали высокое накопление фитостеролов.

Таблица 5. Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса фитостеролы с использованием PASS Online

Table 5. Prediction of the pharmacological activity of identified compounds of the phytosterol class using PASS Online

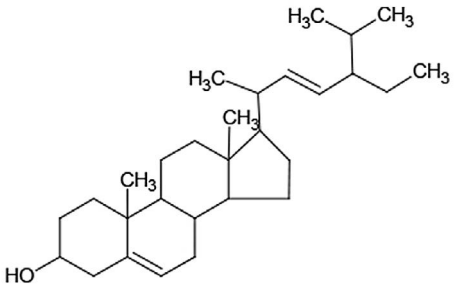
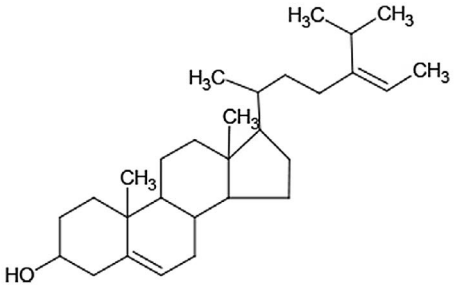
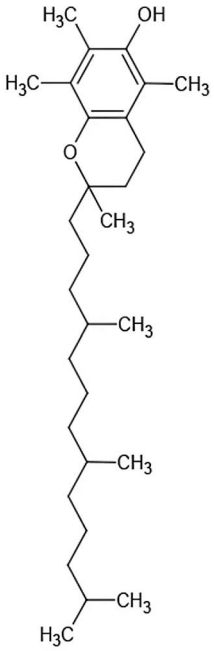
Название вещества Substance name	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	Pa	Pi
Стигмастерол Stigmasterol		Антигиперхолестеринемическая активность Antihypercholesterolemic	0,970	0,002
		Антагонист холестерина Cholesterol antagonist	0,965	0,001
		Гиполипидемическая активность Hypolipemic	0,900	0,004
Изофусостерол Isofucosterol		Антигиперхолестеринемическая активность Antihypercholesterolemic activity	0,941	0,002
		Антагонист холестерина Cholesterol antagonist	0,927	0,002
		Гиполипидемическая активность Hypolipemic activity	0,873	0,005
		Гепатопротектор Hepatoprotectant	0,797	0,004
		Ингибитор синтеза холестерола Cholesterol synthesis inhibitor	0,722	0,001

Таблица 6. Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений класса витамины с использованием PASS Online

Table 6. Prediction of the pharmacological activity of identified compounds of the vitamin class using PASS Online

Название вещества Substance name	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	Pa	Pi
α-Токоферол α-Tocopherol		Ингибитор липидпероксидазы Lipid peroxidase inhibitor	0,970	0,002
		Гиполипидемическая активность Hypolipemic activity	0,846	0,005
		Противовоспалительная активность Antiinflammatory activity	0,814	0,006
		Антагонист холестерина Cholesterol antagonist	0,799	0,005

Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений показало возможность использования данных веществ в качестве регуляторов метаболизма. Перечень видов активностей охватывает коррекцию многих нарушений, связанных с избыточным накоплением жировой ткани в организме, включая метаболизм углеводов и липидов, заболевания сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, заболевания печени и хроническое воспаление жировой ткани.

По результатам работы можно сделать вывод о том, что корнеплоды и черешки сельдерея являются целевым источником липофильных соединений, таких как терпены, производные бензофуранов и кумарины, которые могут быть использованы в комплексной терапии ожирения.

Кроме того, результаты исследования позиционируют фитостеролы как целевую группу БАВ липофильной фракции ввиду большого накопления и наличия высокой вероятности проявления гиполипидемической и гипохолестеринемической активностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sandner G., König A., Wallner M., Weghuber J. Functional foods – dietary or herbal products on obesity: Application of selected bioactive compounds to target lipid metabolism. *Current Opinion in Food Science*. 2020;34:9–20. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.09.011.
2. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Gloriozova T. A., Rudik A. V, Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chem Heterocycl Comp*. 2014;50:444–457. DOI: 10.1007/s10593-014-1496-1.
3. Дедов И. И., Шестакова М. В., Мельниченко Г. А., Мазурина Н. В., Андреева Е. Н., Бондаренко И. З., Гусова З. Р., Дзгоева Ф. Х., Елисеев М. С., Ершова Е. В., Журавлева М. В., Захарчук Т. А., Исаков В. А., Клепикова М. В., Комшилова К. А., Крысанова В. С., Недогода С. В., Новикова А. М., Остроумова О. Д., Переверзев А. П., Роживанов Р. В., Романцова Т. И., Руяткина Л. А., Саласюк А. С., Сасунова А. Н., Сметанина С. А., Стародубова А. В., Суплотова Л. А., Ткачева О. Н., Трошина Е. А., Хамошина М. Б., Чечельницкая С. М., Шестакова Е. А., Шереметьева Е. В. Междисциплинарные клинические рекомендации «Лечение ожирения и коморбидных заболеваний». *Ожирение и метаболизм*. 2021;18(1):5–99. DOI: 10.14341/omet12714.
4. Alkhalidy H., Moore W., Wang A., Luo J., McMillan R. P., Wang Y., Zhen W., Hulver M. W., Liu, D. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2018;58:90–101. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.04.014
5. Baek Y., Lee M. N., Wu D., Pae M. Luteolin reduces adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in postmenopausal obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019;71:72-81, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.06.002.
6. Sudhakar M., Sasikumar S. J., Silambanan S., Natarajan D., Ramakrishnan R., Nair A. J., Kiran M. S. Chlorogenic acid promotes development of brown adipocyte-like phenotype in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*. 2020;74:104161, DOI: 10.1016/j.jff.2020.104161.
7. Mu H. N., Zhou Q., Yang R. Y., Tang W. Q., Li H. X., Wang S. M., Li J., Chen W. X., Dong J. Caffeic acid prevents non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through gut microbiota modulation in mice. *Food Res Int*. 2021;143:110240. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110240.
8. Jang J. H., Park J. E., Han J. S. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research*; 2019:74:52–61 DOI: 10.1016/ j.nutres.2019.12.003.
9. Ganesan K., Xu B. Anti-Diabetic Effects and Mechanisms of Dietary Polysaccharides. *Molecules*. 2019;24(14):2556. DOI: 10.3390/molecules24142556.
10. Gumede N. M., Lembede B. W., Brooksbank R. L., Erlwanger K. H., Chivandi E. β-Sitosterol Shows Potential to Protect Against the Development of High-Fructose Diet-Induced Metabolic Dysfunction in Female Rats. *J Med Food*. 2020;23(4):367–374. DOI: 10.1089/jmf.2019.0120.
11. Bacanlı M., Anlar H. G., Aydın S., Çal T., Arı N., Ündeğer B. Ü., Başaran A. A., Başaran N. d-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2017;110:434–442. DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.020.
12. Kumar V., Kumar V., Mahajan N., Kaur J., Devi K., Dharavath R. N., Singh R. P., Kondepudi K. K., Bishnoi M. Mucin secretory action of capsaicin prevents high fat diet-induced gut barrier dysfunction in C57BL/6 mice colon. *Biomed Pharmacother*. 2022;145:112452. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112452.
13. Bhattacharjee K., Nath M., Choudhury Y. Berberine is as effective as the anti-obesity drug Orlistat in ameliorating betel-nut induced dyslipidemia and oxidative stress in mice. *Phytomedicine plus 1*. 2021;3:100098. DOI: 10.1016/j.phyplu.2021.100098.
14. Al-Asmari A. K., Athar M. T., Kadasah S. G. An Updated Phytopharmacological Review on Medicinal Plant of Arab Region: *Apium graveolens* Linn. *Pharmacogn Rev*. 2017;11(21):13–18. DOI:10.4103/phrev.phrev_35_16.
15. Cho B. O., Choi J., Kang H. J., Che D. N., Shin J. Y., Kim J. S., Kim S. J., Jang S. I. Anti-obesity effects of a mixed extract containing Platycodon grandiflorum, Apium graveolens and green tea in high-fat-diet-induced obese mice. *Exp Ther Med*. 2020;19(4):2783–2791. DOI: 10.3892/etm.2020.8493.
16. Нгуен Т. Х. И. Разработка унифицированных критериев стандартизации травы котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) в рамках требований надлежащей фармакопейной практики (GPhP) и фармакопей стран ЕАЭС. Дис. ... канд. фарм. наук. Санкт-Петербург; 2018. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-unifitsirovannykh-kriteriev-standartizatsii-travy-kotovnika-koshachego-nepeta-sat/read. Ссылка активна на 28.06.2022.

REFERENCES

1. Sandner G., König A., Wallner M., Weghuber J. Functional foods – dietary or herbal products on obesity: Application of selected bioactive compounds to target lipid metabolism. *Current Opinion in Food Science*. 2020;34:9–20. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.09.011.
2. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Gloriozova T. A., Rudik A. V, Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chem Heterocycl Comp*. 2014;50:444–457. DOI: 10.1007/s10593-014-1496-1.
3. Dedov I. I., Shestakova M. V., Mel'nichenko G. A., Mazurina N. V., Andreeva E. N., Bondarenko I. Z., Gusova Z. R., Dzgoeva F. H., Eliseev M. S., Ershova E. V., Zhuravleva M. V., Zaharchuk T. A., Isakov V. A., Klepikova M. V., Komshilova K. A., Krysanova V. S., Nedogoda S. V., Novikova A. M., Ostroumova O. D., Pereverzev A. P., Rozhivanov R. V., Romancova T. I., Rujatkina L. A., Salasjuk A. S., Sasunova A. N., Smetanina S. A., Starodubova A. V., Suplotova L. A., Tkacheva O. N., Troshina E. A., Hamoshina M. B., Chechel'nickaja S. M., Shestakova E. A., Sheremet'eva E. V. Interdisciplinary clinical guidelines "Treatment of obesity and comorbid diseases".

Ozhirenie i metabolizm. 2021;18(1):5–99. (In Russ.) DOI: 10.14341/omet12714.

4. Alkhalidy H., Moore W., Wang A., Luo J., McMillan R. P., Wang Y., Zhen W., Hulver M. W., Liu, D. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2018;58:90–101. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.04.014
5. Baek Y., Lee M. N., Wu D., Pae M. Luteolin reduces adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in postmenopausal obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019;71:72-81, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.06.002.
6. Sudhakar M., Sasikumar S. J., Silambanan S., Natarajan D., Ramakrishnan R., Nair A. J., Kiran M. S. Chlorogenic acid promotes development of brown adipocyte-like phenotype in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*. 2020;74:104161, DOI: 10.1016/j.jff.2020.104161.
7. Mu H. N., Zhou Q., Yang R. Y., Tang W. Q., Li H. X., Wang S. M., Li J., Chen W. X., Dong J. Caffeic acid prevents non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet through gut microbiota modulation in mice. *Food Res Int*. 2021;143:110240. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110240.
8. Jang J. H., Park J. E., Han J. S. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research*; 2019:74:52–61 DOI: 10.1016/ j.nutres.2019.12.003.
9. Ganesan K., Xu B. Anti-Diabetic Effects and Mechanisms of Dietary Polysaccharides. *Molecules*. 2019;24(14):2556. DOI: 10.3390/molecules24142556.
10. Gumede N. M., Lembede B. W., Brooksbank R. L., Erlwanger K. H., Chivandi E. β-Sitosterol Shows Potential to Protect Against the Development of High-Fructose Diet-Induced Metabolic Dysfunction in Female Rats. *J Med Food*. 2020;23(4):367–374. DOI: 10.1089/jmf.2019.0120.
11. Bacanlı M., Anlar H. G., Aydın S., Çal T., Arı N., Ündeğer B. Ü., Başaran A. A., Başaran N. d-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2017;110:434–442. DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.020.
12. Kumar V., Kumar V., Mahajan N., Kaur J., Devi K., Dharavath R. N., Singh R. P., Kondepudi K. K., Bishnoi M. Mucin secretory action of capsaicin prevents high fat diet-induced gut barrier dysfunction in C57BL/6 mice colon. *Biomed Pharmacother*. 2022;145:112452. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112452.
13. Bhattacharjee K., Nath M., Choudhury Y. Berberine is as effective as the anti-obesity drug Orlistat in ameliorating betel-nut induced dyslipidemia and oxidative stress in mice. *Phytomedicine plus 1*. 2021;3:100098. DOI: 10.1016/j.phyplu.2021.100098.
14. Al-Asmari A. K., Athar M. T., Kadasah S. G. An Updated Phytopharmacological Review on Medicinal Plant of Arab Region: *Apium graveolens* Linn. *Pharmacogn Rev*. 2017;11(21):13–18. DOI:10.4103/phrev.phrev_35_16.
15. Cho B. O., Choi J., Kang H. J., Che D. N., Shin J. Y., Kim J. S., Kim S. J., Jang S. I. Anti-obesity effects of a mixed extract containing Platycodon grandiflorum, Apium graveolens and green tea in high-fat-diet-induced obese mice. *Exp Ther Med*. 2020;19(4):2783–2791. DOI: 10.3892/etm.2020.8493.
16. Nguen T. H. I. Development of unified criteria for standardization of the grass of the cat's cat (*Nepeta cataria* L.) in the framework of the requirements of good pharmacopoeia practice (GPhP) and pharmacopoeia of the EAEU countries. [Dissertation.] Saint Petersburg; 2018. Available at: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-unifitsirovannykh-kriteriev-standartizatsii-travy-kotovnika-koshachego-nepeta-sat/read. Accessed: 28.06.2022. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-195-201
УДК 615.011; 576.08

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение кишечной проницаемости на модели Caco-2 производного фенилтетрагидрохинолиндиона с $TRPA_1$-антагонистической активностью

Н. В. Пятигорская, А. Д. Кравченко✉

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

✉ **Контактное лицо:** Кравченко Алексей Дмитриевич. **E-mail:** aleksej_kravchenko97@mail.ru

ORCID: Н. В. Пятигорская – http://orcid.org/0000-0003-4901-4625; А. Д. Кравченко – http://orcid.org/0000-0001-6476-0138.

Статья поступила: 15.11.2021 **Статья принята в печать:** 11.04.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Данная работа посвящена изучению кишечной проницаемости инновационного биологически активного вещества – 7-(2-хлорфенил)-4-(4-метил-1,3-тиазол-5-ил)-4,6,7,8-тетрагидрохинолин-2,5(1H,3H)-диона с $TRPA_1$-антагонистической активностью. Данное производное фенилтетрагидрохинолиндиона может стать перспективным анальгетическим и противовоспалительным средством, для разработки лекарственной формы которого необходимо обладать информацией о механизмах и степени его абсорбции в желудочно-кишечном тракте.

Цель. Целью данного исследования являлось изучение кишечной проницаемости производного фенилтетрагидрохинолиндиона на культуре клеток Caco-2 и сопоставление полученных результатов с рассчитанными значениями коэффициентов распределения октанол/вода.

Материалы и методы. Исследование проницаемости проводилось со стороны апикальной мембраны к базолатеральной (A-B) и в обратном направлении (B-A). В качестве контрольных соединений выступали: ранитидин (низкая проницаемость), пропранолол (высокая проницаемость) и родамин 123 (субстрат Pgp-транспортера). Определение концентрации исследуемого соединения проводили с помощью УЭЖХ-МС/МС системы, состоящей из жидкостного хроматографа и тандемного масс-спектрометра с тройным квадруполем и электрораспылительным ионным источником. Расчет LogP проводился с помощью следующих ресурсов: ChemDraw Professional 16.0, Molinspiration, ALOGPS 2.1.

Результаты и обсуждение. Для исследуемого и контрольных соединений были получены значения коэффициента кажущейся проницаемости (P_{app}) и коэффициента эффлюкса, на основании которых были сделаны следующие выводы: исследуемое соединение обладает высокой кишечной проницаемостью как в прямом направлении от апикальной к базолатеральной мембране клеток, так и в обратном направлении (P_{app} больше 10×10^{-6} см/с); асимметрии транспорта, характерной для субстратов Pgp (P-гликопротеина) и других активных транспортеров, не наблюдается (коэффициент эффлюкса менее 2 единиц); зависимости проницаемости от концентрации исследуемого соединения не наблюдается. Рассчитанные экспериментальные значения P_{app} согласуются с полученными *in silico* значениями коэффициентов распределения октанол/вода, наилучшая корреляционная зависимость была установлена для miLogP (Molinspiration) и CLogP (ChemDraw).

Заключение. Таким образом, полученные *in vitro* и *in silico* данные говорят о пассивной диффузии – как об основном механизме всасывания производного фенилтетрагидрохинолиндиона в желудочно-кишечном тракте.

Ключевые слова: кишечная проницаемость, Caco-2, $TRPA_1$

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

Вклад авторов. Н. В. Пятигорская спланировала эксперимент и отредактировала текста статьи. А. Д. Кравченко выполнил экспериментальную часть и написал текст статьи.

Для цитирования: Пятигорская Н. В., Кравченко А. Д. Изучение кишечной проницаемости на модели Caco-2 производного фенилтетрагидрохинолиндиона с $TRPA_1$-антагонистической активностью. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):195–201. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-195-201

Caco-2 Intestinal Permeability Study of Phenyltetrahydroquinolinedione Derivative – $TRPA_1$ Antagonist

Natalya V. Pyatigorskaya, Aleksey D. Kravchenko✉

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

✉ **Corresponding author:** Aleksey D. Kravchenko. **E-mail:** aleksej_kravchenko97@mail.ru

ORCID: Natalya V. Pyatigorskaya – http://orcid.org/0000-0003-4901-4625; Aleksey D. Kravchenko – http://orcid.org/0000-0001-6476-0138.

Received: 15.11.2021 **Revised:** 11.04.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. This work is devoted to the intestinal permeability study of 7-(2-chlorophenyl)-4-(4-methyl-1,3-thiazol-5-yl)-4,6,7,8-tetrahydroquinoline-2,5(1H,3H)-dione – innovative biologically active substance with $TRPA_1$ antagonist activity. The phenyltetrahydroquinolinedione derivative is a promising analgesic and anti-inflammatory drug. To develop a dosage form of this new substance, it is necessary to study the mechanism and degree of its absorption.

© Пятигорская Н. В., Кравченко А. Д., 2022
© Pyatigorskaya N. V., Kravchenko A. D., 2022

Aim. The aim of this work was to investigate the intestinal permeability of the phenyltetrahydroquinolinedione derivative using Caco-2 cell model and to compare experimental results with the *in silico* obtained values of the octanol/water partition coefficients.
Materials and methods. The study of permeability was carried out from the apical membrane to the basolateral (A-B) and in the opposite direction (B-A). Ranitidine (low permeability), propranolol (high permeability) and rhodamine 123 (P-glycoprotein substrate) were used as control compounds. The concentration of the test compound was determined by UHPLC-MS/MS system consisting of a liquid chromatograph and a tandem mass spectrometer with a triple quadrupole and an electrospray ion source. The LogP was calculated using the following resources: ChemDraw Professional 16.0, Molinspiration, ALOGPS 2.1.
Results and discussion. The values of the apparent permeability (Papp) and efflux ratios of the test and control compounds were obtained. According to the results of the study, the following conclusions were made: the test compound has high permeability both in the forward direction from the apical to the basolateral cell membrane, and in the opposite direction (Papp > 10×10^{-6} cm/s). P-glycoprotein-mediated efflux activity was not observed (the efflux ratio was less than 2 units). The permeability did not depend on the test compound input concentration. The obtained experimental Papp values were correlated with the in silico obtained values of partition coefficients. The best correlation was obtained for miLogP (Molinspiration) and CLogP (ChemDraw).
Conclusion. Thus, the *in vitro* and *in silico* obtained data indicate that passive diffusion is the main mechanism of absorption of the test compound in the gastrointestinal tract.

Keywords: intestinal permeability, Caco-2, $TRPA_1$

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. Natalya V. Pyatigorskaya planned the experiment and edited the text of the article. Aleksey D. Kravchenko set up the experiment and wrote the text of the article.

For citation: Pyatigorskaya N. V., Kravchenko A. D. Caco-2 intestinal permeability study of phenyltetrahydroquinolinedione derivative – $TRPA_1$ antagonist. *Drug development & registration*. 2022;11(3):195–201. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-195-201

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для оценки степени проницаемости через кишечную мембрану применяются три основных подхода: *in vivo* (на живых организмах), *ex vivo* (на изолированных тканях) и *in vitro* (на биомиметических мембранах или культурах клеток). На ранних этапах разработки лекарственных средств часто применяется способ *in vitro* благодаря его относительной простоте и экономичности. Среди методов *in vitro* наиболее широкое распространение получила культура клеток аденокарциномы толстого кишечника – Caco-2 [1]. Исследование проницаемости на культуре клеток Caco-2 является методом, способным с достаточной достоверностью прогнозировать абсорбцию *in vivo* [2–4]. К недостаткам данного метода можно отнести то, что при изучении проницаемости *in vitro*, в отличие от исследований на живых организмах и изолированных тканях, не учитывается влияние физиологических факторов: желудочно-кишечного сока, кинетики желудочно-кишечного тракта, различие в экспрессии транспортеров, значении трансэпителиального электрического сопротивления и др. [1]. Из-за гетерогенности культуры клеток и условий их культивирования для данного теста также характерна невысокая межлабораторная воспроизводимость, в связи с чем получаемые в исследовании на культуре клеток Caco-2 данные не интерпретируются количественно [5]. Однако в качественной оценке проницаемости биологически активных веществ данные недостатки считаются незначительными и нивелируются за счет применения контрольных веществ с известной биодоступностью [6]. В качестве внутренних стандартов, рекомендованных FDA для оценки проницаемости, в данной работе применялись: ранитидин (Р), обладающий низкой кишечной абсорбцией, пропранолол (П), для которого характерна высокая проницаемость и родамин 123 (Р123) – субстрат транспортера Р-гликопротеина (Pgp) [7], в качестве ингибитора которого выступал циклоспорин А (ЦА).

Изучаемое соединение (ИС) – 7-(2-хлорфенил)-4-(4-метил-1,3-тиазол-5-ил)-4,6,7,8-тетрагидрохинолин-2,5(1H,3H)-дион в доклинических исследованиях продемонстрировало перспективные результаты с точки зрения анальгетической и противовоспалительной активности [8], что послужило причиной дальнейшего изучения свойств данного соединения с целью разработки его лекарственной формы. Для обоснования способа введения лекарственного вещества, выбора лекарственной формы и технологии получения лекарственного средства широко применяется подход, основанный на биофармацевтической классификационной системе (БКС) [9]. Для установления класса БКС, от которого будет зависеть дальнейший подход к разработке лекарственного средства, содержащего ИС, необходимо обладать информацией о проницаемости данного соединения, которая согласно руководству FDA, в частности, может быть получена на культуре клеток Caco-2.

Таким образом, **целью данной работы** являлось изучение кишечной проницаемости производного фенилтетрагидрохинолиндиона *in vitro* на культуре клеток Caco-2, а также сопоставление полученных данных с рассчитанными с помощью разных ресурсов значениями коэффициентов распределения октанол/вода LogP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе исследования были использованы материалы и оборудование: линия клеток Caco-2 (American Type Culture Collection – ATCC, кат. № HTB-37, США), 96-луночный планшет для автосэмплера 0,5 мл (Agilent, кат. № 5042-1386, США); Millicell-96 планшет с фильтром и резервуаром для изучения транспорта через клеточный монослой 0,4 мкн PCF (Millipore, кат. № PSHT004S5, США); OptiPlate-384, White Opaque 384-луночный планшет (Perkin Elmer, кат. № 6007299, США), хроматограф для ультраэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, США); масс-спектрометр QTRAP 5500 (Sciex Corp, США); измеритель сопротивления Millicell-ERS (Millipore, кат. № MERS00001, США); углекислотные инкубаторы (Sanyo; Sheldon Mfg. Inc., Япония); центрифуга для пробирок 5810R (Eppendorf, Германия).

Выбор концентрации изучаемого соединения

Исходные концентрации исследуемого соединения были выбраны с учетом рекомендаций руководства FDA по изучению проницаемости веществ *in vitro* [7], согласно которому считается, что вещество обладает пассивной диффузией, если его проницаемость не зависит от исходной концентрации вещества в диапазоне 0,01-, 0,1-, 1-кратной максимальной дозы, растворенной в 250 мл воды, а также не зависит от направления (коэффициент эффлюкса составляет от 0,5 до 2). Ориентировочная однократная терапевтическая доза изучаемого соединения составляет 10 мг, поэтому изначально для исследования были выбраны концентрации: 0,4, 4 и 40 мкг/мл, находящиеся в пределах требуемого диапазона. Однако первоначальные результаты показали нерастворимость вещества в концентрациях 4 мкг/мл и выше, в связи с чем было проведено повторное исследование проницаемости в концентрациях: 0,001, 0,01 и 0,1 мкг/мл.

Культивирование Caco-2 клеток

Линия клеток Caco-2 была получена из коммерчески доступного набора ATCC (кат. № HTB-37) и культивировалась согласно рекомендациям ATCC и Millipore [10] во флаконах на 75 см^2 при 37 °C и среде 5 % CO_2. Клетки пересевали 2 раза в неделю в соотношении 1:6. Среда для культивирования Caco-2 клеток содержала: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, кат. № 11965084, США), 0,584 г/л L-глутамина (ООО «ПанЭко», кат. № Ф032, Россия), 10 % бычьей сыворотки (HyClone, кат. № SH30070.03), 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (ООО «ПанЭко», кат. № А065, Россия), 2 % незаменимых аминокислот (ООО «ПанЭко», кат. № Ф116, Россия).

Посадка и инкубация клеток

Для проведения эксперимента Caco-2 клетки 10–50 пассажа в состоянии 80–90 % покрытия флакона помещали в планшеты с двухкомпонентными ячейками Millicell-96 в количестве 10 000 на 0,11 см^2 лунку, что соответствует 90 909 клеток/см^2. Дно внутренней части ячейки состояло из полупроницаемого фильтра, на котором образовывался клеточный монослой. Культуру клеток инкубировали в течение 21 дня со сменой среды 2 раза в неделю в первые 2 недели и 3 раза в последнюю. С помощью прибора Millicell-ERS измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление, которое должно было составлять не менее 3 кОм/лунку в случае целостности монослоя клеток.

Методика эксперимента

Готовили буферные растворы исследуемого и контрольных веществ с добавлением или без добавления циклоспорина А.

Для определения проницаемости из апикальной (A) в базолатеральную (B) область добавляли по 90 мкл буферных растворов тестируемых веществ в верхние лунки с фильтрами и по 250 мкл буферного раствора, не содержащего веществ, в лунки нижнего транспортного планшета. При определении проницаемости из базолатеральной (B) области в апикальную (A) добавляли по 250 мкл буферных растворов тестируемых соединений в нижние лунки и по 90 мкл буферных растворов без веществ в верхние лунки планшета. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Инкубировали собранную Millicell-96 Caco-2 систему в течение 2 ч при 37 °C на шейкере при 300 об/мин. Разъединяли верхнюю и нижнюю части планшета.

Отбирали по 70 мкл растворов из верхней и нижней частей планшета в отдельные пробирки в штативе, затем в каждую добавляли по 210 мкл охлажденного до +4 °C раствора, содержащего ацетонитрил и воду очищенную (1:1) и 200 нг/мл внутреннего стандарта толбутамида (IS). Образцы хранили при температуре не выше –70 °C до УЭЖХ-МС/МС анализа.

Характеристика биоаналитического метода

Определение концентрации анализируемых веществ проводили с помощью УЭЖХ-МС/МС системы, состоящей из жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity UHPLC и масс-спектрометра QTRAP 5500 с тройным квадруполем и электрораспылительным модулем TurboIonSpray.

Оптимизированные УЭЖХ-МС/МС параметры определения вещества приведены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры УЭЖХ-МС/МС метода

Table 1. UHPLC-MS/MS system parameters

Подвижная фаза А Mobile phase A	0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде 0.1 % formic acid in water				
Подвижная фаза В Mobile phase B	0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле 0.1 % formic acid in acetonitrile				
Хроматографическая колонка Chromatography column	YMC-Triart C8, 50 × 2 мм, 1,9 мкм YMC-Triart C8, 50 × 2 mm, 1.9 µm				
Градиентная программа Gradient program	Время, мин Time, min	Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	A, %	B, %	
	0,0 1,0 1,6 1,7 2,9	0,5 0,5 0,5 0,5 0,5	50 5 5 50 50	50 95 95 50 50	
Температура колонки Column temperature	40 °C				
Температура в автосэмплере Autosampler temperature	8 °C				
Объем ввода Input volume	0,3 мкл 0.3 µl				
Общее время анализа Total analysis time	2,9 мин 2.9 min				
Время удерживания Retention time	Исследуемое соединение Test compound (TC)	0,48 мин 0.48 min			
	Толбутамид (IS) Tolbutamide (IS)	0,62 мин 0.62 min			
Тип источника ионов Ion source type					Turbo Spray
Режим ионизации Ionization mode					Положительный Positive
Температура источника Source temperature					450 °C
Напряжение в источнике (IS), В Ion spray voltage (IS), V					5500
Газ-завеса (CUR), psi Curtain (CUR) gas, psi					30
Газ-небулайзер (GS1), psi Nebulizer gas (GS1), psi					55
Газ-нагреватель (GS2), psi Heater gas (GS2), psi					25
Потенциал на входе в ячейку соударений (EP), В Entrance Potential (EP), V					10
Аналит Analyte	Q1/Q3 переход Q1/Q3 transition	Время измерения, мсек Dwell time, ms	DP[1], В DP[1], V	CE[2], эВ CE[2], eV	CXP[3], В CXP[3], V
ИС* TC*	373,1/312	50	50	36	10
ИС TC	373,1/339,1	50	50	39	10
IS*	271,1/91	40	136	41	10
IS	271/74	40	136	17	12

Примечание. * Использовался для количественного расчета; [1] DP – декластеризующий потенциал; [2] CE – энергия соударений; [3] CXP – потенциал на выходе из ячейки соударений.

Note. * Substance was used for quantitative analysis; [1] DP – declustering potential; [2] CE – collision energy; [3] CXP – collision cell exit potential.

Обработка данных и расчеты

Площади под хроматографическими пиками аналитов, нормированные на сигнал внутреннего стандарта (AUC/IS), использовали для нижеприведенных расчетов.

Коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app}, см/с) рассчитывали по формуле (1):

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{\text{Area} \times \text{Time}} \right) \times \left(\frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right), \quad (1)$$

где V_A – объем в акцепторной лунке, который равен 0,25 мл для проницаемости [A-B] и 0,09 мл для проницаемости [B-A]. Area – площадь поверхности, которая составляет 0,11 см^2 для Millicell-96 плашки. Time – время транспорта (7200 с). $C_A(t)$ – AUC/IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента; $C_D(0)$ – AUC/IS исходного раствора вещества в донорной лунке.

Рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app}) веществ в обоих направлениях в присутствии и без добавления циклоспорина А, а также коэффициент эффлюкса (КЭ), то есть отношение P_{app} (B-A)/P_{app} (A-B), показывающее разницу в проницаемости, возникающую за счет активного транспорта. Если данное отношение находится в диапазоне от 0,5 до 2,0, то вещество не подвергается активному транспорту [7]. Для субстратов Pgp и других активных транспортеров значение коэффициента эффлюкса приближается к 1 в присутствии циклоспорина А.

Массовый баланс по окончании эксперимента рассчитывали по формуле (2):

$$\text{Извлечение } (\%) = 100 \times \left(\frac{C_A(t) \times V_a + C_D(t) \times V_d}{C_D(0) \times V_d} \right), \quad (2)$$

где $C_A(t)$ – AUC/IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента; $C_D(t)$ – AUC/IS вещества в донорной лунке после эксперимента; V_a – объем в акцепторной лунке, мл; V_d – объем в донорной лунке, мл.

Коэффициенты распределения октанол/вода: CLogP, miLogP, ALogP были получены с помощью следующих программ и ресурсов: ChemDraw Professional 16.0, Molinspiration, ALOGPS 2.1 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 2 приведены результаты определения проницаемости исследуемого соединения и контрольных веществ. Растворы изучаемого соединения с концентрациями 4 мкг/мл и 40 мкг/мл характеризуются низким процентом извлечения, указывающим на неполный переход вещества в растворимое состояние, что подтверждается наблюдаемой опалесценцией растворов, поэтому результаты, полученные при данных концентрациях, не учитывались при оценке проницаемости исследуемого соединения.

Сравнение значений коэффициентов кажущейся проницаемости исследуемого соединения в диапазоне концентраций от 0,001 мкг/мл до 0,4 мкг/мл с коэффициентами P_{app} пропранолола ($23{,}3 \times 10^{-6}$ см/с) и P_{app} ранитидина ($1{,}4 \times 10^{-6}$ см/с), полученными в аналогичных условиях, позволяет достоверно отнести исследуемое соединение к группе веществ с высокой кишечной проницаемостью. При этом производное фенилтетрагидрохинолиндиона демонстрирует высокую проницаемость как в прямом направлении от апикальной к базолатеральной мембране A-B, так и в обратном направлении B-A ($P_{app} > 23{,}3 \times 10^{-6}$ см/с). Асимметрии транспорта, характерной для типичного Pgp-субстрата – родамина 123, для которого коэффициент эффлюкса >2 (фактическое значение 2,10) в отсутствии циклоспорина А и приближается к 1 (фактическое значение 0,98) в эксперименте с циклоспорином А, для исследуемого соединения не наблюдается (коэффициент эффлюкса 1,30). Зависимости коэффициентов проницаемости от концентрации для исследуемого соединения также не отмечено (R^2 для линейной зависимости = 0,183).

Таким образом, согласно руководству [7] исследуемое вещество обладает высокой кишечной проницаемостью, а также всеми признаками, характерными для веществ, способных посредством пассивной диффузии проникать через клеточные мембраны.

Полученные средние значения коэффициентов кажущейся проницаемости исследуемого и контрольных веществ были сопоставлены с соответствующими рассчитанными величинами коэффициентов распределения октанол/вода (таблица 3).

Полученные экспериментальные результаты согласуются с рассчитанными значениями LogP, при этом коэффициенты распределения октанол/вода исследуемого соединения для всех программ превышают значения, разделяющие вещества с высокой и низкой проницаемостью: согласно исследованию [11] значение CLogP должно превышать 1,35, согласно работе [12] – CLogP должен быть больше 1,49, ALogP – больше 1,61. Подобных данных для miLogP не было найдено в открытом доступе, поэтому с учетом того, что в указанных исследованиях разделяющим стандартом выступал метопролол, можно считать, что miLogP исследуемого соединения, превышающий таковой для метопролола (1,97), также согласуется с полученными экспериментальными данными. В рамках данного исследования наиболее крепкая корреляция была установлена для ресурсов Molinspiration и ChemDraw, низкое значение коэффициента детерминации, установленное для ALOGPS 2.1, и разброс полученных значений LogP (RSD для изучаемого соединения составляет 24,7 %) могут быть объяснены разными подходами к расчету и базами данных экспериментальных значений LogP, используемыми данными ресурсами для установления зависимости «структура – свойство».

Таблица 2. **Проницаемость и асимметрия транспорта веществ на модели клеток Caco-2**

Table 2. **Permeability and asymmetry of substance transport on the model of Caco-2 cells**

№ опыта Experiment No.	Соединение, концентрация Compound, concentration	P_{app} A-B, $\times10^{-6}$ см/с P_{app} A-B, $\times10^{-6}$ cm/s	RSD A-B, %	P_{app} B-A, $\times10^{-6}$ см/с P_{app} B-A, $\times10^{-6}$ cm/s	RSD B-A, %	КЭ EC	Извлечение AB/BA, % Recovery AB/BA, %
1	ИС, 40 мкг/мл TC, 40 μg/ml	13,50	2,1	13,80	1,5	1,02	28,0/29,8
1	ИС, 4 мкг/мл TC, 4 μg/ml	5,09	33,8	3,99	12,3	0,78	19,0/22,6
1	ИС, 0,4 мкг/мл TC, 0.4 μg/ml	43,10	10,4	26,20	4,2	0,61	99,4/109,0
2	ИС, 0,1 мкг/мл TC, 0.1 μg/ml	56,90	15,7	43,80	3,6	0,77	125,0/114,0
2	ИС, 0,01 мкг/мл TC, 0.01 μg/ml	28,20	11,0	55,60	1,6	1,97	79,0/92,8
2	ИС, 0,001 мкг/мл TC, 0.001 μg/ml	27,40	6,7	50,50	3,0	1,84	68,7/67,4
1	Р123 R123	2,49	31,7	6,05	8,3	2,43	75,7/81,5
1	Р123 + ЦА R123 + CA	0,60	10,0	0,41	9,8	0,68	74,3/74,5
1	Ранитидин Ranitidine	0,87	10,3	–	–	–	112,0
1	Пропранолол Propranolol	22,70	7,5	–	–	–	69,2
2	Р123 R123	2,60	7,7	4,59	8,5	1,77	64,6/72,4
2	Р123 + ЦА R123 + CA	0,29	3,4	0,37	5,4	1,28	79,4/85,5
2	Ранитидин Ranitidine	1,94	27,8	–	–	–	105,0
2	Пропранолол Propranolol	23,8	6,3	–	–	–	63,5

Примечание. – Не проводилось исследование.

Note. – No research has been carried out.

Таблица 3. **Корреляционная зависимость между коэффициентами кажущейся проницаемости и рассчитанными коэффициентами распределения**

Table 3. **Correlation between the apparent permeability coefficient and the calculated partition coefficients**

Соединение Compound	P_{app}, $\times10^{-6}$ см/с P_{app}, $\times10^{-6}$ cm/s	CLogP ChemDraw	miLogP Molinspiration	ALogP ALOGPS 2.1
ИС TC	38,9	2,17	2,90	1,79
Ранитидин Ranitidine	1,4	0,67	0,33	0,79
Пропранолол Propranolol	23,3	2,75	2,97	3,03
R^2 для линейной зависимости R^2 for linear regression model		0,585	0,811	0,281

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов, полученных при изучении проницаемости производного фенилтетрагидрохинолиндиона на культуре клеток Caco-2, можно сделать выводы, что для исследуемого вещества характерна высокая степень кишечной абсорбции, превосходящая таковую для пропранолола – стандарта с высокой проницаемостью по БКС – и не зависящая от концентрации изучаемого соединения. Также для производного фенилтетрагидрохинолиндиона было показано отсутствие сродства к эффлюкс транспортеру Pgp и, следовательно, согласно руководству [7] изучаемое соединение удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к веществам, способным к пассивной диффузии через клеточные мембраны. Полученные экспериментальные результаты подтверждаются рассчитанными значениями коэффициентов распределения октанол/вода, которые для всех программ превышают согласно литературным данным значения LogP, разделяющие вещества с высокой и низкой проницаемостью. Однако не

для всех использованных ресурсов удалось установить корреляционную зависимость между коэффициентами кажущейся проницаемости и полученными *in silico* значениями LogP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xu Y., Shrestha N., Préat V., Beloqui A. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;175:113795. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.005.
2. Skolnik S., Lin X., Wang J., Chen X.-H., He T., Zhang B. Towards Prediction of In Vivo Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(7):3246–3265. DOI: 10.1002/jps.22080.
3. Volpe D. A., Faustino P. J., Ciavarella A. B., Asafu-Adjaye E. B., Ellison C. D., Yu L. X., Hussain A. S. Classification of Drug Permeability with a Caco-2 Cell Monolayer Assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 2007;24(1):39–47. DOI: 10.1080/10601330701273669.
4. Yee S. In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man – Fact or Myth. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(6):763–766. DOI: 10.1023/a:1012102522787.
5. Lee J. B., Zgair A., Taha D. A., Zang X., Kagan L., Kim T. H., Kim M. G., Yun H.-Y., Fischer P. M., Gershkovich P. Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;114:38–42. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.12.027.
6. Volpe D. A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(2):712–725. DOI: 10.1002/jps.21010. DOI: 10.1002/jps.21010.
7. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Dec. 2017. Available at: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/UCM070246.pdf. Accessed: 27.01.2022.
8. Бесхмельницына Е. А., Покровский М. В., Должиков А. А., Автина Т. В., Жернакова Н. И., Пересыпкина А. А. Исследование анальгетической и противовоспалительной активности нового неопиоидного анальгетика на основе селективного ингибитора ионных каналов TRPA1. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2019;26(1):77–87.
9. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
10. Phillips J., Arena A. Optimization of Caco-2 cell growth and differentiation for drug transport studies. *Millipore Corporation Protocol Note*. PC1060EN00. 2003.
11. Kasim N. A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A. S., Junginger H. E., Stavchansky S. A., Midha K. K., Shah V. P., Amidon G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*. 2004;1(1):85–96. DOI: 10.1021/mp034006h.
12. Dahan A., Wolk O., Agbaria R. Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development. *Drug Design, Development and Therapy*. 2014;24(8):1563–1575. DOI: 10.2147/DDDT.S68909.

REFERENCES

1. Xu Y., Shrestha N., Préat V., Beloqui A. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;175:113795. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.005.
2. Skolnik S., Lin X., Wang J., Chen X.-H., He T., Zhang B. Towards Prediction of In Vivo Intestinal Absorption Using a 96-Well Caco-2 Assay. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(7):3246–3265. DOI: 10.1002/jps.22080.
3. Volpe D. A., Faustino P. J., Ciavarella A. B., Asafu-Adjaye E. B., Ellison C. D., Yu L. X., Hussain A. S. Classification of Drug Permeability with a Caco-2 Cell Monolayer Assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 2007;24(1):39–47. DOI: 10.1080/10601330701273669.
4. Yee S. In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man – Fact or Myth. *Pharmaceutical Research*. 1997;14(6):763–766. DOI: 10.1023/a:1012102522787.
5. Lee J. B., Zgair A., Taha D. A., Zang X., Kagan L., Kim T. H., Kim M. G., Yun H.-Y., Fischer P. M., Gershkovich P. Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;114:38–42. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.12.027.
6. Volpe D. A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(2):712–725. DOI: 10.1002/jps.21010. DOI: 10.1002/jps.21010.
7. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Dec. 2017. Available at: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/UCM070246.pdf. Accessed: 27.01.2022.
8. Beskhmelnitsyna E. A., Pokrovskii M. V., Dolzhikov A. A., Avtina T. V., Zhernakova N. I., Peresypkina A.A. Study of the Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of a New Non-Opioid Analgesic Based on a Selective Inhibitor of TRPA1 Ion Channels. *Kubanskii Nauchnyi Meditsinskii Vestnik*. 2019;26(1):77–87. (In Russ.)
9. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Drug development & registration*. 2017;(2):56–60. (In Russ.)
10. Phillips J., Arena A. Optimization of Caco-2 cell growth and differentiation for drug transport studies. *Millipore Corporation Protocol Note*. PC1060EN00. 2003.
11. Kasim N. A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A. S., Junginger H. E., Stavchansky S. A., Midha K. K., Shah V. P., Amidon G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*. 2004;1(1):85–96. DOI: 10.1021/mp034006h.
12. Dahan A., Wolk O., Agbaria R. Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development. *Drug Design, Development and Therapy*. 2014;24(8):1563–1575. DOI: 10.2147/DDDT.S68909.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-202-208
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка способа и схемы применения живой рекомбинантной коклюшной вакцины «ГамЖВК». Безопасность и переносимость двукратной интраназальной вакцинации здоровыми взрослыми добровольцами

Г. И. Каратаев[1]✉, А. Ю. Медкова[1], Е. Г. Сёмин[1], Л. Н. Синяшина[1], Р. А. Сюндюкова[1], С. В. Куликов[1], Н. А. Снегирёва[1,3], И. Н. Чернышова[1,3], М. В. Гаврилова[1,3], К. К. Бушкова[3], А. А. Лиджиева[1] ✉✉, Л. В. Колобухина[1], И. С. Кружкова[1], Л. Н. Меркулова[1], М. Г. Русанова[2], М. В. Базарова[3], Н. А. Антипят[3], С. В. Сметанина[3], Е. А. Смолярчук[4], И. Н. Дьяков[1, 3]

[1] ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России), 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
[2] ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»), 125310, Россия, г. Москва, Волоколамское ш., д. 63
[3] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова), 105064, Россия, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а
[4] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Каратаев Геннадий Иванович. **E-mail:** karataevgi@rambler.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Лиджиева Алина Анатольевна. **E-mail:** saadq@yandex.ru

ORCID: Г. И. Каратаев – https://orcid.org/0000-0001-8771-6092; А. Ю. Медкова – https://orcid.org/0000-0002-1509-0622; Е. Г. Сёмин – https://orcid.org/0000-0001-6696-8362; Л. Н. Синяшина – https://orcid.org/0000-0003-1708-5453; Р. А. Сюндюкова – https://orcid.org/0000-0001-5600-1967; С. В Куликов – https://orcid.org/0000-0001-7478-3624; Н. А. Снегирёва – https://orcid.org/0000-0002-5399-3224; И. Н. Чернышова – https://orcid.org/0000-0001-5053-2433; М. В. Гаврилова – https://orcid.org/0000-0002-6936-2486; К. К. Бушкова – https://orcid.org/0000-0002-4757-0751; А. А. Лиджиева – https://orcid.org/0000-0002-1537-6444; Л. В. Колобухина – https://orcid.org/0000-0001-5775-3343; И. С. Кружкова – https://orcid.org/0000-0002-4327-6985; Л. Н. Меркулова – https://orcid.org/0000-0002-7260-0879; М. Г. Русанова – https://orcid.org/0000-0001-6818-4107; М. В. Базарова – https://orcid.org/0000-0001-7322-7896; Н. А. Антипят – https://orcid.org/0000-0001-8578-2838; С. В. Сметанина – https://orcid.org/0000-0003-3763-697X; Е. А. Смолярчук – https://orcid.org/0000-0002-2615-7167; И. Н. Дьяков – https://orcid.org/0000-0001-5384-9866;

Статья поступила: 18.03.2022 **Статья принята в печать:** 01.07.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Рост заболеваемости коклюшем как детей, так и взрослых разных возрастных групп обосновывает необходимость вакцинации/ревакцинации и разработки новых, приемлемых для этих целей, коклюшных вакцин. Настоящая работа посвящена описанию результатов сравнительного изучения безопасности и переносимости препарата «ГамЖВК» при двукратном интраназальном введении здоровым взрослым добровольцам двумя методами. Обоснован выбор схемы и способа введения препарата. Охарактеризована серологическая структура специфических противококлюшных антител в популяции взрослых людей в возрасте 18–40 лет, проживающих в г. Москве и Московской области.

Цель. Определение безопасности и переносимости препарата «ГамЖВК» при двукратном интраназальном введении вакцины капельным способом и распылением через актуатор.

Материалы и методы. В рандомизированное плацебо-контролируемое исследование было включено 50 здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 18 до 40 лет, удовлетворяющих критериям включения. Добровольцы разделены на 2 группы по 25 человек в каждой: капельный способ введения и распыление через актуатор. В обеих группах препарат «ГамЖВК» вводили двукратно с интервалом 60 дней.

Результаты и обсуждение. Серологический анализ на наличие в популяции здоровых добровольцев специфических противококлюшных антител на этапе предскрининга обосновал включение в исследование добровольцев, содержащих в крови противококлюшные антитела IgG на уровне меньше 40 Ед/мл. Сопоставление результатов доклинических исследований препарата «ГамЖВК» на экспериментальной модели нечеловекообразных обезьян и клинических исследований первой фазы позволило предложить два способа двукратного введения препарата в качестве перспективной схемы вакцинации. В сравнительном рандомизированном исследовании показана безопасность использования предложенной схемы для вакцинации взрослых добровольцев.

Заключение. Обе предложенные схемы двукратного введения могут быть использованы для планирования многоцентрового исследования с целью изучения иммуногенности и защитной активности ГамЖВК.

Ключевые слова: коклюш, клиническое исследование, живая вакцина, безопасность, переносимость, двукратное введение вакцины

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

Вклад авторов. Г. И. Каратаев, А. Ю. Медкова, Л. Н. Синяшина разработали дизайн протокола клинического исследования. А. А. Лиджиева, Л. В. Колобухина, И. С. Кружкова, Л. Н. Меркулова, М. Г. Русанова, М. В. Базарова, Н. А. Антипят, С. В. Сметанина, И. Н. Дьяков, Н. А. Снегирева, И. Н. Чернышова, М. В. Гаврилова, К. К. Бушкова выполняли работы по клиническому исследованию. Г. И. Каратаев, А. Ю. Медкова, Г. Е. Семин, Л. Н. Синяшина, А. А. Лиджиева, Р. А. Сюндюкова, С. В. Куликов, Е. А. Смолярчук проводили обработку и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

© Каратаев Г. И., Медкова А. Ю., Сёмин Е. Г., Синяшина Л. Н., Сюндюкова Р. А., Куликов С. В., Снегирёва Н. А., Чернышова И. Н., Гаврилова М. В., Бушкова К. К., Лиджиева А. А., Колобухина Л. В., Кружкова И. С., Меркулова Л. Н., Русанова М. Г., Базарова М. В., Антипят Н. А., Сметанина С. В., Смолярчук Е. А., Дьяков И. Н., 2022
© Karataev G. I., Medkova A. Yu., Semin E. G., Sinyashina L. N., Sioundioukova R. A., Kulikov S. V., Snegireva N. A., Chernishova I. N., Gavrilova M. V., Bushkova K. K., Lidzhieva A. A., Kolobukhina L. V., Kruzhkova I. S., Merkulova L. N., Rusanova M. G., Bazarova M. V., Antipyat N. A., Smetanina S. V., Smolyarchuk E. A., Dyakov I. N., 2022

Для цитирования: Каратаев Г. И., Медкова А. Ю., Сёмин Е. Г., Синяшина Л. Н., Сюндюкова Р. А., Куликов С. В., Снегирёва Н. А., Чернышова И. Н., Гаврилова М. В., Бушкова К. К., Лиджиева А. А., Колобухина Л. В., Кружкова И. С., Меркулова Л. Н., Русанова М. Г., Базарова М. В., Антипят Н. А., Сметанина С. В., Смолярчук Е. А., Дьяков И. Н. Разработка способа и схемы применения живой рекомбинантной коклюшной вакцины «ГамЖВК». Безопасность и переносимость двукратном интраназальном вакцинации здоровыми взрослыми добровольцами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):202–208. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-202-208

Development of a Method and a Scheme for the Use of a Live Recombinant Vaccine "GamLPV". Safety and Tolerability of Double Intranasal Vaccination of Healthy Adult Volunteers

Gennadiy I. Karataev[1]✉, Alisa Yu. Medkova[1], Evgeniy G. Semin[1], Ludmila N. Sinyashina[1], Rezida A. Sioundioukova[1], Sergey V. Kulikov[1], Nadezhda A. Snegireva[1,3], Irina N. Chernishova[1,3], Marina V. Gavrilova[1,3], Kristina K. Bushkova[3], Alevtina A. Lidzhieva[1]✉✉, Ludmila V. Kolobukhina[1], Irina S. Kruzhkova[1], Ludmila N. Merkulova[1], Marina G. Rusanova[3], Marina V. Bazarova[3], Natalia A. Antipyat[3], Svetlana V. Smetanina[3], Elena A. Smolyarchuk[4], Ilya N. Dyakov[2]

[1] N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, 18, Gamalei str., Moscow, 123098, Russia
[2] Infectious Clinical Hospital No. 1 of the Department of Health of the City of Moscow, 63, Volokolamskoe highway, Moscow, 125310, Russia
[3] Federal State Budgetary Scientific Institution "I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera", 5a, Malyy Kazennyy lane, Moscow, 105064, Russia
[4] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Gennadiy I. Karataev. **E-mail:** karataevgi@rambler.ru
✉✉ **Corresponding author:** Alevtina A. Lidzhieva. **E-mail:** saadq@yandex.ru

ORCID: Gennadiy I. Karataev – https://orcid.org/0000-0001-8771-6092; Alisa Yu. Medkova – https://orcid.org/0000-0002-1509-0622; Evgeniy G.Semin – https://orcid.org/0000-0001-6696-8362; Ludmila N. Sinyashina – https://orcid.org/0000-0003-1708-5453; Rezida A. Sioundioukova – https://orcid.org/0000-0001-5600-1967; Sergey V. Kulikov – https://orcid.org/0000-0001-7478-3624; Nadezhda A. Snegireva – https://orcid.org/0000-0002-5399-3224; Irina N. Chernishova – https://orcid.org/0000-0001-5053-2433; Marina V. Gavrilova – https://orcid.org/0000-0002-6936-2486; Kristina K. Bushkova – https://orcid.org/0000-0002-4757-0751; Alevtina A. Lidzhieva – https://orcid.org/0000-0002-1537-6444; Ludmila V. Kolobukhina – https://orcid.org/0000-0001-5775-3343; Irina S. Kruzhkova – https://orcid.org/0000-0002-4327-6985; Ludmila N. Merkulova – https://orcid.org/0000-0002-7260-0879; Marina G. Rusanova – https://orcid.org/0000-0001-6818-4107; Marina V. Bazarova – https://orcid.org/0000-0001-7322-7896; Natalia A. Antipyat – https://orcid.org/0000-0001-8578-2838; Svetlana V. Smetanina – https://orcid.org/0000-0003-3763-697X; E. A. Smolyarchuk – https://orcid.org/0000-0002-2615-7167; Ilya N. Dyakov – https://orcid.org/0000-0001-5384-9866.

Received: 18.03.2022 **Revised:** 01.07.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The increase in the incidence of whooping cough in children and adults of different age groups justifies the need for their revaccination and the development of new, acceptable for these purposes. This work is devoted to substantiating the design of a clinical trial and describing the results of a comparative study of the safety and tolerability of the drug "GamLPV" with two-fold intranasal administration to healthy adult volunteers using two methods. The choice of the scheme and method of administration of the drug is justified. The serological structure of the population of adults aged 18–40 years living in Moscow and the Moscow region is characterized.

Aim. Determination of the safety and tolerability of the drug with a double intranasal administration of the vaccine by drip method and spraying through an actuator.

Materials and methods. A randomized placebo-controlled trial included 50 healthy male and female volunteers aged 18 to 40 years who met the inclusion criteria. The volunteers were divided into 2 groups of 25 people: a drip method of administration and spraying through an "actuator". By both methods, the drug was administered twice with an interval of 60 days.

Results and discussion. Serological analysis of the population of healthy volunteers at the prescreening stage justified the inclusion in the study of volunteers containing anti-pertussis antibodies in the blood (IgG ≤40 Ed/ml). A comparison of the results of preclinical studies on an experimental model of non-human monkeys and the first phase of a clinical study of GamLPV allowed us to propose two methods of double administration of the drug as a promising vaccination scheme for volunteers. A comparative randomized study shows the safety of using the proposed scheme for vaccination of adult volunteers.

Conclusions. Both proposed methods of double administration can be used to plan a multicenter study to research the immunogenicity and protective activity of GamLPV.

Keywords: pertussis, live vaccine, anti-pertussis vaccine, safety, tolerability, double administration of the vaccine

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. Gennadiy I. Karataev, Alisa Yu. Medkova, Ludmila N. Sinyashina developed the design of the clinical trial Protocol. Alevtina A. Lidzhieva, Ludmila V. Kolobukhina, Irina S. Kruzhkova, Ludmila N. Merkulova, Marina G. Rusanova, Marina V. Bazarova, Natalia A. Antipyat, Svetlana V. Smetanina, Ilya N. Dyakov, Nadezhda A. Snegireva, Irina N. Chernishova, Marina V. Gavrilova, Kristina K. Bushkova performed the work for a clinical trial. Gennadiy I. Karataev, Alisa Yu. Medkova, Evgeniy G. Semin, Ludmila N. Sinyashina, Alevtina A. Lidzhieva, Rezida A. Sioundioukova, Sergey V. Kulikov, Elena A. Smolyarchuk participated in data interpretation. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Karataev G. I., Medkova A. Yu., Semin E. G., Sinyashina L. N., Sioundioukova R. A., Kulikov S. V., Snegireva N. A., Chernishova I. N., Gavrilova M. V., Bushkova K. K., Lidzhieva A. A., Kolobukhina L. V., Kruzhkova I. S., Merkulova L. N., Rusanova M. G., Bazarova M. V., Antipyat N. A., Smetanina S. V., Smolyarchuk E. A., Dyakov I. N. Development of a method and a scheme for the use of a live recombinant vaccine "GamLPV". Safety and tolerability of double intranasal vaccination of healthy adult volunteers. *Drug development & registration*. 2022;11(3):202–208. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-202-208

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на массовую вакцинацию, коклюш остается важным и опасным заболеванием, уносящим ежегодно сотни тысяч жизней детей, главным образом младенческого возраста [1]. В последние годы отмечается рост числа лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых [1–3], распространение стертых форм заболевания, а также выявление бессимптомных носителей бактерий *B. pertussis* [2–5]. Рост заболеваемости коклюшем среди детей старшего возраста и взрослых привел к пониманию необходимости введения ревакцинации подростков и взрослых, в том числе беременных и членов их семей для формирования «кокона» [1–6]. Предлагаемая для этих целей бесклеточная коклюшная вакцина оказалась низкоэффективной, поскольку не обеспечивает противобактериальный иммунитет [7–10].

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ разработан препарат «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша». Результаты первой фазы клинического исследования показали безопасность и иммуногенность трех исследованных доз препарата «ГамЖВК» при однократном интраназальном капельном введении здоровым добровольцам [11]. Результаты доклинического исследования ГамЖВК на взрослых обезьянах показали выраженную иммуногенность и защитную активность на фоне высокого уровня безопасности и хорошей переносимости 2- и 3-кратного интраназального введения препарата [12]. Исследования показали дозозависимый характер формирования иммунного ответа. Для проведения клических исследований выбрана доза 5×10^9 КОЕ аттенуированных бактерий *B. pertussis* [11–13]. По данным клинических исследований I фазы, выявлен значительный разброс числа геном эквивалентов ДНК *B. pertussis* (ГЭ) в носоглотке добровольцев, измеренный в одинаковых контрольных точках, что могло быть связано с использованием несовершенного, на первый взгляд, метода капельного введения препарата. Кроме того, в исследовании серологического статуса добровольцев на этапе, предшествующем скринингу, в крови значительного числа обследованных добровольцев обнаружены специфические IgG и IgM к антигенам возбудителя коклюша. Приведенные выше аргументы привели к необходимости пересмотра схемы и способа интраназального введения препарата в сравнении с предыдущим исследованием.

Настоящая работа посвящена обоснованию нового дизайна исследования и описанию результатов сравнительного изучения безопасности и переносимости препарата «ГамЖВК» при двукратном интраназальном введении здоровыми взрослыми добровольцами двумя способами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на основании разрешения Минздрава РФ на проведение клинического исследования № 382 от 02.08.2018 г. Основные критерии включения: уровень специфических антител IgG к возбудителю коклюша не более 40 МЕ/мл; отсутствием специфических IgM к антигенам *B. pertussis*; отсутствие ДНК *B. pertussis* в назофарингеальных мазках, подтвержденное методом ПЦР. Другие критерии включения/исключения не отличались от критериев I фазы клинического исследования и приведены на сайте ClinicalTrials.govPRS и в наших работах [11, 13]. Соответствие критериям включения подтверждалось в соответствии с ранее описанными методиками [11–13].

Добровольцы были разделены на 2 группы по 25 человек: капельный способ интраназального введения и распыление посредством актуатора. После рандомизации добровольцам обеих групп проводили инокуляцию препарата «ГамЖВК» в дозе 5×10^9 КОЕ по следующей схеме: 25 человек получили препарат интраназально капельно и 25 человек путем распыления с помощью актуатора; в каждой группе 5 участников получили плацебо. Обоими способами препарат «ГамЖВК» вводили двукратно с интервалом 60 дней. Присвоенная при рандомизации группа (капельный способ или способ распыления) в течение исследования изменялась.

Контрольные точки для оценки безопасности и параметров иммуногенности проводили до введения препарата «ГамЖВК», сразу после введения и далее на 2-е, 8-е, 15-е, 29-е, 60-е, 61-е, 68-е, 75-е, 89-е и 120-е сутки после каждого введения ГамЖВК. Для ИФА анализа использовали тест-системы RIDASCREEN® Bordetella IgG, IgM (R-Biopharm AG, Германия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов описательной статистики [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснование выбора схемы и способа введения препарата «ГамЖВК» для вакцинации добровольцев. Результаты первой фазы клинических исследований показали безопасность и максимальную иммуногенность однократного интраназального капельного введения 5×10^9 КОЕ аттенуированных бактерий *B. pertussis* [11] и позволили проследить сроки их элиминации из носоглотки добровольцев. Однако значительный разброс значений числа ГЭ (геном эквивалентов) *B. pertussis* в исследуемых назофарингеальных аспиратах привел к заключению о необходимости стандартизации способа введения препарата «ГамЖВК». Было сделано предположение, что использование способа распыления препарата «ГамЖВК» поможет решить поставленную задачу. Для интраназального распыления препарата «ГамЖВК» была использована насадка актуатора надетая взамен иглы на медицинский шприц объемом 2 мл. Актуатор поставляется производителем в виде отдельного стерильного изделия в индивидуальной упаковке. Этот способ технически отличался от использованного в первой фазе клинических исследований, и определенного нами как «капельный». При капельном интраназальном введении растворенный препарат

«ГамЖВК» набирали по 0,5 мл с помощью шприца 2 мл с иглой и вводили по 0,25 мл в каждый носовой ход тем же шприцем без иглы. При введении препарата распылением использовали ту же процедуру, но на шприц перед введением надевали актуатор и распыляли суспензию в том же объеме 0,25 мл в каждый носовой ход резким движением поршня. В качестве плацебо применяли стерильный лиофилизат стабилизатора препарата «ГамЖВК», растворенный в 0,9%-м натрия хлорида. Препарат «ГамЖВК» вводили в положении лежа на спине или сидя с запрокинутой головой.

Исследования выживаемости аттенуированных бактерий *B. pertussis* при титровании на среде КУА с кровью не выявили статистически достоверных различий после распылении через актуатор или капельного внесения в пробирку, что подтверждало возможность использования актуатора для интраназальной вакцинации. Ожидалось, что использование актуатора стандартизирует процедуру введения препарата «ГамЖВК» и может привести к некоторому увеличению эффективности выбранной дозы для адгезии в респираторном тракте. Такое допущение требовало не только определения сравнительной эффективности нового способа введения, но и проверки его безопасности в сравнении с капельным.

Как отмечено выше, исходя из данных экспериментов, проведенных на модели нечеловекообразных обезьян, повторная иммунизация препаратом «ГамЖВК» приводила к развитию более выраженного иммунного ответа и ускоренному его проявлению. Бустерный ответ, так же как и ускоренная динамика элиминации аттенуированных бактерий *B. pertussis*, был выражен и после экспериментального инфицирования иммунизированных обезьян вирулентными бактериями *B. pertussis* [11].

Анализ представленных данных доклинического исследования позволил обосновать выбор дизайна клинического исследования, предполагающего двукратную иммунизацию добровольцев разными способами интраназального введения препарата «ГамЖВК», имеющих целью оптимизацию процесса вакцинации «ГамЖВК».

Серологический анализ популяции здоровых добровольцев на этапе прескрининговых и скрининговых исследований. Обоснование критерия включения добровольцев, у которых содержание IgG ≤40 Ед/мл.

Рядом исследователей показано, что в популяции взрослых и подростков число серопозитивных к возбудителю коклюша увеличивается с возрастом [15, 16]. Это вероятнее всего объясняется циркуляцией бактерий *B. pertussis* и большим числом контактов с инфекцией, обусловленных недиагностированных случаев атипичного течения заболевания, а также бессимптомного бактерионосительства. Авторы показали, что среди обследованных здоровых подростков в возрасте 15–17 лет доля серопозитивных к возбудителю коклюша превышает 80 %. В обширном международном исследовании также показано, что более 80 % взрослого населения в возрасте от 40 до 65 лет в разных количествах присутствуют антитела к коклюшному токсину [15, 16].

В проведенном нами клиническом исследовании приняли участие здоровые добровольцы в возрасте от 18 до 40 лет. Для оценки серологической структуры выбранной возрастной группы было проведено определение количества специфических IgG и IgM к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютинину (ФГА) в случайной выборке у добровольцев, проживающих в г. Москве и Московской области. Исследования проводили в мае 2017 г. и июне 2019 г. с привлечением 98 и 127 добровольцев соответственно. Согласно инструкциям к тест-системам RIDASCREEN® Bordetella IgG, IgM, значения и **IgG** <14 U/ml и **IgM** <11 U/ml в сыворотке крови характерно для людей с отрицательным диагнозом «коклюш», значения 14 < **IgG** < 18 U/ml и 11 < **IgM** < 17 U/ml не позволяют поставить определенный диагноз. Значения 18 < **IgG** U/ml и 17 < **IgM** U/ml трактуются авторами как характерные при коклюше. В рамках настоящей работы приведены результаты анализа суммарной популяции добровольцев, участвующих в обоих исследованиях, выполненных в один эпидемиологический период (поздняя весна-лето) (рисунок 1).

Рисунок 1 иллюстрирует, что при использовании критерия включения: здоровые добровольцы с отрицательным содержанием специфических IgG и IgM, даже с учетом сывороток с пограничным значением (+/–), только немногим больше 40 % добровольцев подходят для исследования. Есть основание полагать, что полученные цифры отражают серологический статус популяции, по крайней мере подмосковной популяции здоровых добровольцев указанного возраста. Так как в настоящее время не установлена корреляция между уровнем специфических антител и их защитной активностью, то с нашей точки зрения нет оснований для исключения более 50 % населения активного возраста из программы вакцинации. Это допущение послужило основанием для расширения критерия включения до значений **IgG** <40 U/ml при отрицательных результатах для **IgM** <11 U/ml. Представленные результаты демонстрируют схожие цифры количества серонегативных участников среди обследованных практически здоровых добровольцев разного возраста.

Безопасность и переносимость препарата «ГамЖВК» при двукратном введении добровольцам. Безопасность и переносимость препарата оценивали на основании частоты регистрации нежелательного явления (НЯ), обусловленных наличием субъективных жалоб, изменений жизненно важных показателей, данных ЭКГ, пикфлоуметрии, а также результатов лабораторных исследований мочи и крови, результатов физикального осмотра в период после подписания информированного согласия.

Анализ результатов по безопасности и переносимости препарата «ГамЖВК» проводили с использованием двух подходов. Первый состоял в статистическом анализе отличий каждого из измеренных лабораторных показателей у добровольцев, получивших препарат или плацебо, и сопоставлении их с лабораторными нормами исследовательского центра ГБУЗ «ИКБ

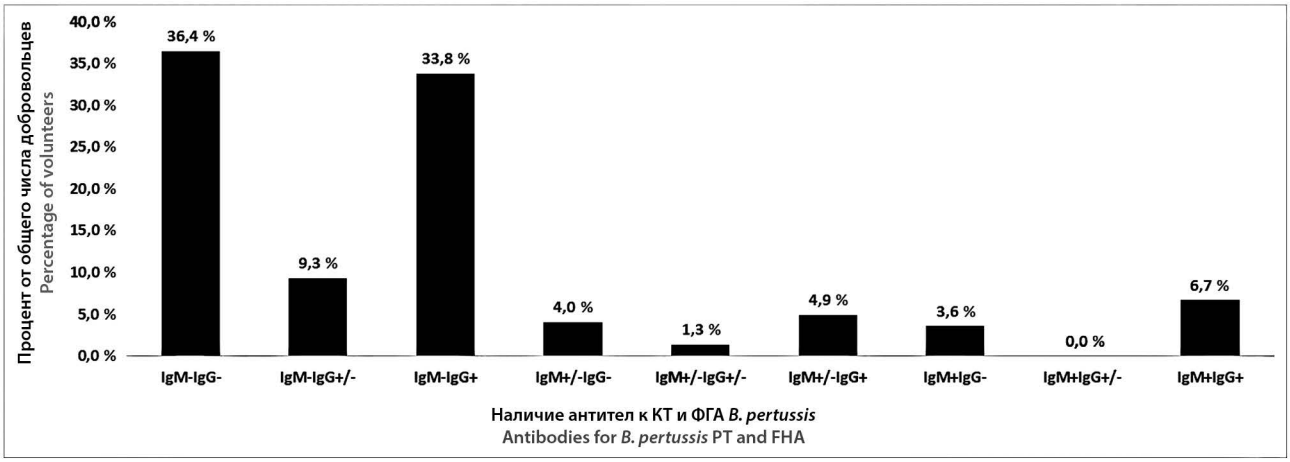


Рисунок 1. Распределение добровольцев в зависимости от наличия IgM- и IgG-антител к *B. pertussis*. IgM–, IgG– – отрицательный результат анализа; IgM+, IgG+ – положительный результат анализа; IgM+/–, IgG+/– – неопределенный результат анализа.

Figure 1. Distribution of volunteers depending on the presence of IgM and IgG antibodies to *B. pertussis*. IgM–, IgG– – negative result of analysis; IgM+ , IgG+ – positive result of analysis; IgM+/–, IgG+/– – indefinite result of analysis.

№ 1 ДЗМ». Для оценки достоверности различий между средними значениями показателей у добровольцев, получивших препарат «ГамЖВК» или плацебо, использовали критерий Стьюдента [14]. Число степеней свободы *f* определяли по формуле:

$$f = (n_1 + n_2) - 2,$$

где $n_1 + n_2$ – число участников в каждой из сравниваемых групп, равное для сравнения капельного введения с плацебо (20 + 10 – 2) = 28, для распыления с плацебо (19 + 10 – 2) = 27 и объединенной выборки (39 + 10 – 2) = 47. Табличные значения *t* при $p = 0,05$ и $f = 28$, 27 и 47 составили, соответственно, 2,048, 2,052, 2,013. Анализ результатов общего анализа крови (ОАК), биохимического анализов крови (БАК) и анализов мочи (АМ) показал, что абсолютное большинство лабораторных показателей у добровольцев, получивших препарат «ГамЖВК» или плацебо, не имеют значимых различий. Практически все средние значения показателей находятся в пределах допустимой нормы лаборатории ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ». Исключение составляет небольшое превышение (до 12 %) среднего значения нормы уробилиногена мочи в 5 временных точках, в том числе и в двух случаях группе плацебо; во всех остальных случаях значения находились на верхней границе нормы ИКБ № 1; статистически достоверных различий в исследуемой группе и группе плацебо по уровню уробилиногена в моче не выявлено. Скорее всего, отмеченные отклонения связаны с особенностью определения параметра в ИКБ № 1. Через 7 дней после первой и повторной иммунизации обнаружены минимальные отличия между плацебо и вакцинированными ГамЖВК по сегментоядерным нейтрофилам в крови добровольцев; в обоих случаях значения находились в пределах нормы ИКБ № 1. Спустя 7 дней после первой вакцинации зарегистрировано на минимальном уровне достоверности превышение в содержании моноцитов крови вакцинированных в сравнении с плацебо, при сохранении их значений в пределах нормы. В последующие сроки значения всех показателей приходили в норму. У добровольцев, рандомизированных для введения препарата «ГамЖВК» путем распыления, до введения было отмечено на минимальном уровне достоверности более низкое содержание альбумина в крови (на 8 %). Так же как и в других случаях средние значения показателей находились в пределах лабораторных норм ИКБ № 1 и не регистрировались на следующих визитах. Представленные результаты указывали на отсутствие статистически достоверных различий измеренных лабораторных показателей между группами добровольцев, получивших плацебо и препарат «ГамЖВК».

Незначительные отличия лабораторных показателей в анализах крови и мочи, выявленные у некоторых добровольцев в разные сроки после первого и второго введения препарата «ГамЖВК», не имели регулярного характера; в большинстве случаев регистрировались на фоне аналогичных изменений в анализах добровольцев в ряде случаев у получивших плацебо, и по мнению врачей-исследователей не имели клинического значения и связи с интраназальным введением препарата «ГамЖВК».

Следует отметить повышение артериального давления у трех добровольцев с максимумом систолического и диастолического до 147 и 91 мм рт. ст. соответственно, и быстрой нормализацией в день первого введения препарата/плацебо, что вероятнее всего связано с эмоциональным фактором. По данным ЭКГ отмечена незначительная брадикардия с максимумом снижения до 50 уд. в минуту, что может являться вариантом нормы у здоровых лиц молодого возраста и быть связанным с физиологической кардиотренированностью. Патологических клинически значимых изменений на электрокардиограммах за все время исследования выявлено не было.

У одного добровольца было зафиксировано нежелательное явление (НЯ) – острая респираторная

вирусная инфекция, протекавшее в легкой форме, при этом клинически диагноз «коклюш» не подтвердился. По данным пикфлоуметрии патологических изменений не выявлено. Каких-либо местных и общих реакций организма добровольцев после первого и второго введения ГамЖВК не зафиксировано. Все зарегистрированные НЯ за все время проведения исследования не имели четкой связи с применением препарата «ГамЖВК» или плацебо.

В исследование было рандомизировано 50 здоровых добровольцев, однако завершили участие только 48. Два добровольца отказались от участия в исследовании после рандомизации: один – до первой вакцинации, второй – перед второй вакцинацией; и это не было связано с нежелательными явлениями или вопросами безопасности, но обусловлено желанием участника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование позволило предложить применение двух способов интраназального введения живой рекомбинантной коклюшной вакцины «ГамЖВК» – капельного и распыление с помощью актуатора. Показано, что оба способа интраназального введения препарата «ГамЖВК» здоровым добровольцам безопасны и хорошо переносимы на протяжении всего времени наблюдения. Повторное введение препарата «ГамЖВК» не ухудшает его безопасность и переносимость не зависимо от способа введения. Оба способа введения и схема, предполагающая двукратное интраназальное введение препарата «ГамЖВК» с интервалом в 60 дней, могут быть предложены для вакцинации взрослых здоровых добровольцев.

Показана серологическая гетерогенность к возбудителю коклюша в популяции здоровых добровольцев в возрасте 18–40 лет, проживающих в г. Москве и Московской области.

На основании представленных данных подготовлен Протокол следующего этапа клинического исследования перспективной вакцины, а также получено разрешение Минздрава РФ на проведение клинических исследований по протоколу «Рандомизированное слепое плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование иммуногенности и безопасности препарата «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» у здоровых добровольцев» № 332 от 01.07 2021».

ЛИТЕРАТУРА

1. Kilgore P. E., Salim A. M., Zervos M. J., Schmittd H.-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016;29(3):449–486. DOI: 10.1128/CMR.00083-15.
2. Wiley K. E., Zuo Y., Macartney K. K., McIntyre P. B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine*. 2013;31(4):618–625. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.052.
3. Wendelboe A. M., Njamkepo E., Bourillon A., Floret D. D., Gaudelus J., Gerber M., Grimprel E., Greenberg D., Halperin S., Liese J., Muñoz-Rivas F., Teyssou R., Guiso N., Van Rie A. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(4):293–299. DOI: 10.10097/01.inf.0000258699.64164.6d.
4. Медкова А. Ю., Аляпкина Ю. С., Синяшина Л. Н., Амелина И. П., Алексеев Я. И., Каратаев Г. И., Боковой А. Г. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции*. 2010;4:19–22.
5. Salim A. M., Liang Y., Kilgore P. E., Protecting Newborns Against Pertussis: Treatment and Prevention Strategies. *Pediatr Drugs*. 2015;17:425–441. DOI: 10.1007/s40272-015-0149-x.
6. Kandeil W., Van den Ende C., Bunge E. M., Jenkins V. A., Ceregido M. A., Guignard A. Guignard. A systematic review of the burden of pertussis disease in infants and the effectiveness of maternal immunization against pertussis. *Expert Review of Vaccines*. 2020.19(7):621–638. DOI: 10.1080/14760584.2020.1791092.
7. Warfel J. M., Zimmerman L. I., Merkel T. J. Acellular Pertussis Vaccines Protect Against Disease But Fail to Prevent Infection and Transmission in a Nonhuman Primate Model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:787–792. DOI: 10.1073/pnas.1314688110.
8. Wilk M. M., Borkner L., Misiak A., Curham L., Allen A. C., Mills K. H. G. Immunization With Whole Cell But Not Acellular Pertussis Vaccines Primes CD4 TRM Cells That Sustain Protective Immunity Against Nasal Colonization With Bordetella Pertussis. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8:169–85. DOI: 10.1080/22221751.2018.1564630.
9. Holubová J., Stanek O., Brazdilova L., Masin J., Bumba L., Gorringe A. R., Alexander F., Sebo P. Acellular Pertussis Vaccine Inhibits Bordetella Pertussis Clearance From the Nasal Mucosa of Mice. *Vaccines*. 2020;8(4):695. DOI: 10.3390/vaccines8040695.
10. Dubois V., Chatagnon J., Thiriard A., Bauderlique-Le Roy H., Debrie A.-S., Coutte L, Locht C. Suppression of Mucosal Th17 Memory Responses by Acellular Pertussis Vaccines Enhances Nasal Bordetella Pertussis Carriage. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1). DOI: 10.1038/s41541-020-00270-8.
11. Медкова А. Ю., Синяшина Л. Н., Амичба А. А., Семин Е. Г., Шевцова З. В., Матуа А. З., Джидарян А. А., Кубрава Д. Т., Конджария И. Г., Баркая В. С., Миквабия З. Я., Каратаев Г. И. Доклинические исследования безопасности, иммуногенности и защитной активности аттенуированных бактерий Bordetella pertussis на экспериментальной модели Macaca mulatta. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(4):312–323. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-4-3.
12. Медкова А. С., Лиджиева А. А., Семин Е. Г., Синяшина Л. Н., Сюндюкова Р. А., Дьяков И. Н., Колобухина Л. В., Кружкова И. С., Меркулова Л. Н., Русанова М. Г., Антипят Н. А., Сметанина С. В., Каратаев Г. И. Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):114–119. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119.
13. Медкова А. Ю., Лиджиева А. А., Сёмин Е. Г., Синяшина Л. Н., Сюндюкова Р. А., Снегирёва Н. А., Чернышова И. Н., Гаврилова М. В., Бушкова К. К., Колобухина Л. В., Кружкова И. С., Меркулова Л. Н., Русанова М. Г., Дьяков И. Н., Каратаев Г. И. Иммуногенность препарата «Живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» (ГамЖВК) при однократном применении у здоровых добровольцев. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):706–720. DOI: 10.36233/0372-9311-194.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. 459 с.
15. Басов А. А., Цвиркун О. В., Герасимова А. Г., Россошанская Н. В., Бабенко В. Н. Состояние специфического иммунитета к коклюшу в разных возрастных группах детей. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2015;14(3):84–88. DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-3-84-88.
16. Berbers G., van Gageldonk P., van de Kassteele J., Wiedermann U., Desombere I., Dalby T., Toubiana J., Tsiodras S., Ferencz I. P., Mullan K., Griskevicius A., Kolupajeva T., Vestrheim D. F., Palminha P., Popovici O., Wehlin L., Kastrin T., Maďarová L., Campbell H., Ködmön C., Bacci S., Barkoff A.-M., He Q. Circulation of pertussis and poor protection against diphtheria among middle-aged adults in 18 European countries. *Nature Communications*. 2021;12(1):2871. DOI: 10.1038/s41467-021-23114-y.

REFERENCES

1. Kilgore P. E., Salim A. M., Zervos M. J., Schmittd H.-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016;29(3):449–486. DOI: 10.1128/CMR.00083-15.

2. Wiley K. E., Zuo Y., Macartney K. K., McIntyre P. B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine*. 2013;31(4):618–625. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.052.
3. Wendelboe A. M., Njamkepo E., Bourillon A., Floret D. D., Gaudelus J., Gerber M., Grimprel E., Greenberg D., Halperin S., Liese J., Muñoz-Rivas F., Teyssou R., Guiso N., Van Rie A. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(4):293–299. DOI: 10.10097/01.inf.0000258699.64164.6d.
4. Medkova A. Yu., Alyapkina Yu. S., Sinyashina L. N. Amelina I. P., Alekseev Ya. I., Karataev G. I., Bokovoy A. G. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Children infections*. 2010;4:19–22. (In Russ.)
5. Salim A. M., Liang Y., Kilgore P. E., Protecting Newborns Against Pertussis: Treatment and Prevention Strategies. *Pediatr Drugs*. 2015;17:425–441. DOI: 10.1007/s40272-015-0149-x.
6. Kandeil W., Van den Ende C., Bunge E. M., Jenkins V. A., Ceregido M. A., Guignard A. Guignard. A systematic review of the burden of pertussis disease in infants and the effectiveness of maternal immunization against pertussis. *Expert Review of Vaccines*. 2020.19(7):621–638. DOI: 10.1080/14760584.2020.1791092.
7. Warfel J. M., Zimmerman L. I., Merkel T. J. Acellular Pertussis Vaccines Protect Against Disease But Fail to Prevent Infection and Transmission in a Nonhuman Primate Model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:787–792. DOI: 10.1073/pnas.1314688110.
8. Wilk M. M., Borkner L., Misiak A., Curham L., Allen A. C., Mills K. H. G. Immunization With Whole Cell But Not Acellular Pertussis Vaccines Primes CD4 TRM Cells That Sustain Protective Immunity Against Nasal Colonization With Bordetella Pertussis. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8:169–85. DOI: 10.1080/22221751.2018.1564630.
9. Holubová J., Stanek O., Brazdilova L., Masin J., Bumba L., Gorringe A. R., Alexander F., Sebo P. Acellular Pertussis Vaccine Inhibits Bordetella Pertussis Clearance From the Nasal Mucosa of Mice. *Vaccines*. 2020;8(4):695. DOI: 10.3390/vaccines8040695.
10. Dubois V., Chatagnon J., Thiriard A., Bauderlique-Le Roy H., Debrie A.-S., Coutte L, Locht C. Suppression of Mucosal Th17 Memory Responses by Acellular Pertussis Vaccines Enhances Nasal Bordetella Pertussis Carriage. *NPJ Vaccines*. 2021;6(1). DOI: 10.1038/s41541-020-00270-8.
11. Medkova A. Yu., Sinyashina L. N., Amichba A. A., Semin E. G., Shevtsova Z. V., Matua A. Z., Djidaryan A. A., Kubrava D. T., Kondzhariya I. G., Barkaya V. S., Mikvabiya Z. Ya., Karataev G. I. Preclinical studies of safety, immunogenicity and protective activity of attenuated Bordetella pertussis bacteria on the Macaca mulatta model. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2020;97(4):312–323. (In Russ.) DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-4-3.
12. Medkova A. Yu., Lidzhieva A. A., Semin E. G., Sinyashina L. N., Sioundioukova R. A., Dyakov I. N., Kolobukhina L. V., Kruzhkova I. S., Merkulova L. N., Rusanova M. G., Antipyat N. A., Smetanina S. V., Karataev G. I. A clinical study of the safety and tolerability of live nasal vaccines for the prevention of pertussis. *Drug development & registration*. 2021;10(1):114–119. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119
13. Medkova A. Yu., Lidzhiyeva A. A., Semin E. G., Sinyashina L. N., Syundyukova R. A., Snegireva N. A., Chernyshova I. N., Gavrilova M. V., Bushkova K. K., Kolobukhina L. V., Kruzhkova I. S., Merkulova L. N., Rusanova M. G., Dyakov I. N., Karatayev G. I. Immunogenicity of the drug "Live intranasal vaccine for the prevention of pertussis" (GamLPV) with a single use in healthy volunteers. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2021;98(6):706–720. (In Russ.) DOI: 10.36233/0372-9311-194.
14. Glanc S. Primer of biostatistics. Moscow: Praktika; 1998. 459 p. (In Russ.)
15. Basov A. A., Tsvirkun O. V., Gerasimova A. G., Rossoshanskaya N. V., Babenko V. N. Condition of Specific Immunity to Pertussis in Different Age Groups of Children. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;14(3):84–88. (In Russ.) DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-3-84-88.
16. Berbers G., van Gageldonk P., van de Kassteele J., Wiedermann U., Desombere I., Dalby T., Toubiana J., Tsiodras S., Ferencz I. P., Mullan K., Griskevicius A., Kolupajeva T., Vestrheim D. F., Palminha P., Popovici O., Wehlin L., Kastrin T., Maďarová L., Campbell H., Ködmön C., Bacci S., Barkoff A.-M., He Q. Circulation of pertussis and poor protection against diphtheria among middle-aged adults in 18 European countries. *Nature Communications*. 2021;12(1):2871. DOI: 10.1038/s41467-021-23114-y.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-209-219
УДК 616-001.17 + 615 + 541.49 + 678.83

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Исследование эффективности действия препаратов на основе молекулярных комплексов аденозин-полимер на модели термического ожога

Е. Д. Семивеличенко[2]✉, А. А. Ермолаева[2], В. В. Пономаренко[2], А. В. Новоселов[1], Г. А. Плиско[2], Д. Ю. Ивкин[2], В. Г. Антонов[3], В. Е. Карев[4], И. А. Титович[2], А. В. Ерёмин[1]

[1] Институт высокомолекулярных соединений РАН (ИВС РАН), 199004, Россия, г. Санкт-Петербург, В. О. Большой пр., д. 31
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А
[3] ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академии имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, лит. Ж
[4] ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА, 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

✉ **Контактное лицо:** Семивеличенко Евгений Дмитриевич. **E-mail:** evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

ORCID: Е. Д. Семивеличенко – https://orcid.org/0000-0002-8464-7711; А. А. Ермолаева – https://orcid.org/0000-0002-6040-2795;
В. В. Пономаренко – https://orcid.org/0000-0002-8077-3358; А. В. Новоселов – https://orcid.org/0000-0002-3042-2269; Г. А. Плиско – https://orcid.org/0000-0003-0869-3430;
Д. Ю. Ивкин – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864; В. Г. Антонов – https://orcid.org/0000-0001-9910-5395; В. Е. Карев – https://orcid.org/0000-0002-7972-1286;
И. А. Титович – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663; А. В. Еремин – https://orcid.org/0000-0003-3325-187X.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 18.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В современной фармакологии все более широко используются молекулярные комплексы (МК), основанные на донорно-акцепторных или, на более слабых, межмолекулярных взаимодействиях, для стабилизации лекарственных форм в составе фармацевтических субстанций или их целевой доставки. Этот тренд активно развивается, т. к. молекулы образующие МК, имеющий определенный состав и пространственное строение, сохраняются и могут быть освобождены в неизменном виде. Использование МК в паре с «классическими» металлсодержащими координационными соединениями, усиливающими или модифицирующими действие активного компонента, позволяет разрабатывать новые, более эффективные лекарственные препараты с оптимизированными биодоступностью и активностью.

Цель. Оценка ранозаживляющего действия новых субстанций на основе водных систем, содержащих координационные соединения меди(II) или цинка с МК аденозин-сополимер N-винилпирролидона, в сравнении с препаратом Депантол®, на модели термического ожога у мышей.

Материалы и методы. Синтезированы моноядерные алаинатные комплексы $Cu(Ala)_2 \cdot H_2O$ и $Zn(Ala)_2$ (Ala – алаинат-анион), сополимер N-винилпирролидона с кротоновой кислотой (ПВП-КК). Состав полученных соединений подтвержден данными элементного анализа на CHN(S)-анализаторе LECO CHNS(O)-932 (Elemental Microanalysis Ltd, Великобритания). ИК-спектры образцов регистрировались на приборах IRAffinity-1 (Shimadzu, Япония) (методом таблетирования образца с KBr) и IRTracer-100 (Shimadzu, Япония), оснащенном приставкой НПВО Specac Quest (Shimadzu Corporation, Япония). Потенциометрическое титрование функциональных групп сополимера ВП производили с помощью pH-метра PP-20 (Sartorius AG, Германия). Растворы препаратов готовились растворением ПВП-КК в полиэтиленгликоле (ПЭГ-400) с последующим внесением в препарат водной дисперсии аденозина (Ad) и соответствующего комплекса меди(II) или цинка. После моделирования термического ожога III степени оценивалась общая смертность в группах и динамика заживления травмированной области. В ходе эксперимента проводились гистологические исследования участков поврежденной ткани после окрашивания препаратов гематоксилином и эозином и проводилась обобщенная балльная оценка характеристик ожогового процесса, включающая оценку ширины и глубины образующейся рубцовой ткани, выраженности воспалительной инфильтрации и наличие гемосидероза в тканях.

Результаты и обсуждение. Образование МК сополимера N-винилпирролидона с кротоновой кислотой с аденозином позволило приготовить растворы препаратов, содержащие до 5 % (масс.) последнего. В полученных образцах мольное соотношение ПВП-КК : Ad : $M(Ala)_2$ составляло 100 : 10 : 1 (M = Cu^{II}, Zn), уровень pH полученных препаратов был равен 7.0–7.1. Полученные средства наносили на поврежденный участок кожи в объеме по 0,1 мл/сутки, каждой особи, ежедневно в течение 4 недель. Вводные субстанции на основе МК ПВП-КК : Ad : $M(Ala)_2$ показали умеренное ранозаживляющее действие в сравнение с препаратом Депантол®, основанным на водно-жировой эмульсии. Субстанции, не содержащие металлокомплекса и содержащие $Cu(Ala)_2$, показали лучшую эффективность в динамике заживления ожоговой травмы в сравнении с другими исследуемыми субстанциями, что сочеталось с низкой смертностью экспериментальных животных в данных группах (3 случая и 2 случая из 9 особей, соответственно). Препарат сравнения – Депантол®, в свою очередь, показал самый лучший результат, вероятно обусловленный содержанием в его составе, помимо декспантенола, характеризующегося ранозаживляющим действием, антисептика хлоргексидина, и жировой основы, уменьшающей дегидратацию травмированной области.

Заключение. Экспериментальные субстанции, основанные на водных растворах МК аденозина-полимер, показали умеренный ранозаживляющий эффект, сопоставимый с референтным лекарственным средством, что, однако представляет достаточный интерес для дальнейшего изучения подобных композиций, или их модифицированных вариантов с добавлением противомикробных компонентов на моделях термического ожога, с целью создания новых, более эффективных лекарственных препаратов для заживления раневых поверхностей.

Ключевые слова: ожог, травма, молекулярные комплексы, полимеры, аденозин, координационные соединения, гистология

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

© Семивеличенко Е. Д., ЕрмолаеваА. А., Пономаренко В. В., Новоселов А. В., Плиско Г. А., Ивкин Д. Ю., Антонов В. Г., Карев В. Е., Титович И. А., Ерёмин А. В., 2022
© Semivelichenko E. D., Ermolaeva A. A., Ponomarenko V. V., Novoselov A. V., Plisko G. A., Ivkin D. Yu., Antonov V. G., Karev V. E., Titovich I. A., Eremin A. V., 2022

Вклад авторов. А. В. Еремин осуществлял синтез металлсодержащих координационных соединений, получение и исследование образцов полимеров, написание статьи. А. В. Новоселов осуществлял отработку оптимальных составов препаратов, приготовление образцов растворов, содержащих МК, оценку их физико-химических свойств, а также корректировку статьи. А. А. Ермолаева, В. В. Пономаренко и Г. А. Плиско осуществляли уход за лабораторными животными и непосредственное проведение биологических экспериментов и первичную обработку полученных данных. Е. Д. Семивеличенко и Д. Ю. Ивкин осуществляли общее руководство экспериментами с животными, финальную обработку и описание полученных результатов, рецензирование и корректировку статьи. В. Г. Антонов осуществлял общую концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. В. Е. Карев проводил гистологические исследования биологических образцов, критику и корректировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием ресурсов 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: Семивеличенко Е. Д., ЕрмолаеваА. А., Пономаренко В. В., Новоселов А. В., Плиско Г. А., Ивкин Д. Ю., Антонов В. Г., Карев В. Е., Титович И. А., Ерёмин А. В. Исследование эффективности действия препаратов на основе молекулярных комплексов аденозин-полимер на модели термического ожога. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):209–219. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-209-219

Study of the Effectiveness of Drugs Based on Molecular Complexes of Adenosine-polymer on the Model of Thermal Burn

Evgeniy D. Semivelichenko[2]✉, Anastasia A. Ermolaeva[2], Veronika V. Ponomarenko[2], Anton V. Novoselov[1], Grigoriy A. Plisko[2], Dmitry Yu. Ivkin[2], Victor G. Antonov[3], Vadim E. Karev[4], Irina A. Titovich[2], Alexei V. Eremin[1]

[1] Institute of macromolecular compounds, 199004, 31, Bolshoy pr., Saint-Petersburg, Russia
[2] St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[3] S. M. Kirov Military Medical Academy, 6Zh, Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russia
[4] Children's Scientific and Clinical Center of Infectious Diseases, 9, Professor Popov str., St. Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgeniy D. Semivelichenko. **E-mail:** evgeniy.semivelichenko@pharminnotech.com

ORCID: Evgeniy D. Semivelichenko – https://orcid.org/0000-0002-8464-7711; Anastasia A. Ermolaeva – https://orcid.org/0000-0002-6040-2795; Veronika V. Ponomarenko – https://orcid.org/0000-0002-8077-3358; Anton V. Novoselov – https://orcid.org/0000-0002-3042-2269; Grigoriy A. Plisko – https://orcid.org/0000-0003-0869-3430; Dmitry Yu. Ivkin – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864; Victor G. Antonov – https://orcid.org/0000-0001-9910-5395; Vadim E. Karev – https://orcid.org/0000-0002-7972-1286; Irina A. Titovich – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663; Alexei V. Eremin – https://orcid.org/0000-0003-3325-187X.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 18.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. In modern pharmacology, more and more widely used molecular complexes (MC) based on donor-acceptor or, on weaker, intermolecular interactions, to stabilize dosage forms in the composition of pharmaceutical substances or their targeted delivery. This trend is actively developing, because the molecules forming MK, which has a certain composition and spatial structure, are preserved and can be released unchanged. The use of MC in tandem with "classical" metal-containing coordination compounds, which enhance or modify the action of the active component, allows the development of new, more effective drugs with optimized bioavailability and activity.

Aim. Evaluation of the wound-healing effect of new substances based on aqueous systems containing coordination compounds of copper(II) or zinc with MC adenosine-copolymer of N-vinylpyrrolidone, in comparison with the drug Depantol® on a model of thermal burn in mice.

Materials and methods. Mononuclear alainate complexes $Cu(Ala)_2 \cdot H_2O$ and $Zn(Ala)_2$ (Ala – alainate-anion), copolymer of N-vinylpyrrolidone with crotonic acid (PVP-CA) have been synthesized. The composition of the obtained compounds was confirmed by the data of elemental analysis on a CHN (S) analyzer LECO CHNS (O) 932 (Elemental Microanalysis Ltd, Great Britain). IR spectra of the samples were recorded on a IRAffinity-1 (Shimadzu, Japan) instrument (by tabletting a sample with KBr) and a IRTracer-100 (Shimadzu, Japan) instrument equipped with a Specac Quest ATR attachment (Shimadzu Corporation, Japan). Potentiometric titration of the functional groups of the VP copolymer was performed using a PP-20 pH meter (Sartorius AG, Germany). The solutions of the preparations were prepared by dissolving PVP-KK in polyethylene glycol (PEG-400), followed by the addition of an aqueous dispersion of adenosine (Ad) and the corresponding complex of copper(II) or zinc into the preparation. After modeling a thermal burn of the third degree, the overall mortality in the groups and the dynamics of healing of the injured area were assessed. During the experiment, histological studies of areas of damaged tissue after staining of preparations with hematoxylin and eosin were carried out and a generalized scoring assessment of the characteristics of the burn process was carried out, including an assessment of the width and depth of the formed scar tissue, the severity of inflammatory infiltration and the presence of hemosiderosis in the tissues.

Results and discussion. The formation of the MC of the copolymer of N-vinylpyrrolidone with crotonic acid with adenosine made it possible to prepare solutions of preparations containing up to 5 % (wght.) Of the latter. In the obtained samples, the molar ratio of PVP-CA : Ad : $M(Ala)_2$ was 100 : 10 : 1 (M = Cu^{II}, Zn), the pH level of the obtained preparations was 7.0–7.1. The resulting funds were applied to the damaged area of the skin in a volume of 0.1 ml/day, each individual, daily for 4 weeks. Introductory substances based on MC PVP-CA : Ad : $M(Ala)_2$ showed a moderate wound healing effect in comparison with the drug Depantol®, based on a water-fat emulsion. Substances that do not contain a metal complex and contain $Cu(Ala)_2$ showed better efficiency in the dynamics of healing a burn injury in comparison with other studied substances, which was combined with a low mortality rate of experimental animals in these groups (3 cases and 2 cases out of 9 individuals, respectively). The reference drug – Depantol®, in turn, showed the best result, probably due to the content in its composition, in addition to dexpanthenol, which is characterized by a wound-healing effect, chlorhexidine antiseptic, and a fatty base, which reduces the dehydration of the injured area.

Conclusion. Experimental substances based on aqueous solutions of adenosine-polymer MK showed a moderate wound healing effect comparable to the reference drug, which, however, is of sufficient interest for further study of such compositions, or their modified versions with the addition of antimicrobial components on thermal burn models, in order to creation of new, more effective drugs for the healing of wound surfaces.

Keywords: burns, trauma, molecular complexes, polymers, adenosine, coordination compounds, histology

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. Alexei V. Eremin carried out the synthesis of metal-containing coordination compounds, obtaining and researching polymer samples, writing an article. Anton V. Novoselov worked out the optimal compositions of the preparations, prepared samples of solutions containing MC, assessed their physicochemical properties, and also corrected the article. Anastasia A. Ermolaeva, Veronika V. Ponomarenko and Grigoriy A. Plisko took care of laboratory animals and directly carried out biological experiments and primary processing of the obtained data. Evgeniy D. Semivelichenko and Dmitry Yu. Ivkin carried out the general management of experiments with animals, final processing and description of the results obtained, reviewing and correcting the article. Victor G. Antonov carried out the general conceptualization and research methodology, as well as reviewing and correcting the article. Vadim E. Karev conducted histological studies of biological samples, criticized and corrected the article. The article was written with the participation of all co-authors. All of the above authors agreed on the final version of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the resources of the Center for Collective Use "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia" 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: Semivelichenko E. D., Ermolaeva A. A., Ponomarenko V. V., Novoselov A. V., Plisko G. A., Ivkin D. Yu., Antonov V. G., Karev V. E., Titovich I. A., Eremin A. V. Study of the effectiveness of drugs based on molecular complexes of adenosine-polymer on the model of thermal burn. *Drug development & registration.* 2022;11(3):209–219. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-209-219

ВВЕДЕНИЕ

Кожа является первичным барьером физической и иммунной защиты организма против попадания микроорганизмов. Повреждение или инфицирование кожных покровов может иметь фатальные последствия для всего организма. *Ожог* – термическое повреждение кожи [1] и нижележащих тканей, приводит к денатурации входящих в их состав белков, обезвоживанию, тромбозу кровеносных сосудов кожи и в результате – к гибели клеток и повреждению тканей [2], что, при неблагоприятных обстоятельствах приводит к возникновению вторичных инфекций [3]. При возникновении которых, даже несмертельные и изначально незначительные ожоги могут стать причиной длительного лечения, госпитализации и привести к инвалидности[1]. В целом, по ценкам ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более стапятидесяти тысяч случаев смерти от ожоговых травм [4].

Как правило, роль биосовместимых полимеров в современной фармакологии ограничивается или областью вспомогательных веществ или основы буферной системы растворов препаратов или функцией стабилизации лекарственной формы в составе фармсубстанции или в растворе. Однако, все чаще появляются примеры, когда биосовместимые полимеры становятся носителями биологически активных молекул, позволяющих повысить концентрацию действующего вещества в зоне фармакологичекой мишени или регулирующей поступление активного компонента препарата в систему [5, 6]. Одновременно биополимеры, образуя молекулярные комплексы на основе слабых, невалентных взаимодействий полимер-активное вещество могут заметно изменять физиологическое действие препарата, например уменьшать токсичность или повышать биодоступность действующего вещества.

Как пример можно привести «Катапол» – полимерный антисептик, представляющим собой эквимолярный молекулярный комплекс ПВП-КК (рисунок 1) с Катамином АБ [катионом диметилбензилалкиламмония, $(CH_3)_2\,BzN^+\,(C_{12-16}H_{25-33})$]. По сравнению с Катамином АБ, в виде хлоридной соли, Катапол, активный в отношении стафилококков, стрептококков, грамотрицательных бактерий (в том числе кишечной и синегнойной палочек, протея, клебсиеллы), анаэробных бактерий, грибов, плесеней и вирусов имеет меньшую острую токсичность и характеризуется существенно меньшим кожно-раздражающим действием [7]. Еще одним современным примером может быть использование гидрогелей оксида графена для стабилизации вакцин [8] или пегилированных (пегилирование или пэгилирование – ковалентное модифицированние пептидов, белков и других объектов (липосом, наночастиц, лекарственных средств) фраг-

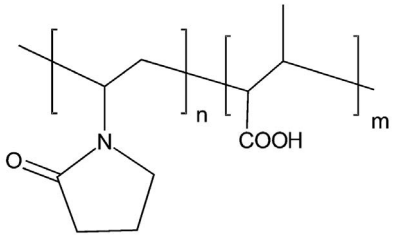


Рисунок 1. Схематическая графическая формула ПВП-КК (n : m = 91 : 9)

Figure 1. Schematic graphic formula of PVP-KK (n : m = 91 : 9)

[1] Всемирная организация здравоохранения. Ожоги. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/burns. Ссылка активна на 20.04.2022.

ментами полиэтиленгликоля (ПЭГ)) липидов в вакцинах от COVID-19 [как в BioNTech (Pfizer Inc., США), так и в Moderna (Moderna Inc., США)] [9, 10].

С точки зрения регенеративной функций чрезвычайно интересен аденозин – эндогенный, биологически важный нуклеозид, модулирующий многие физиологические и патологические процессы, в частности, являющийся сильным противовоспалительным агентом, действующим на 4 рецептора, связанных с G-белком [11]. Показано, что местное применение аденозина для лечения ран конечностей у лабораторных животных существенно ускоряет заживление тканей [12, 13]. Однако из-за малой растворимости и малой биодоступности до настоящеего времени он не используется в дерматовенерологии.

В целом можно сказать, что в ответ на стресс или ранение аденозин проявляет в основном цитопротекторное и противовоспалительное действие [14]. В молекуле Ad пять атомов азота, три из которых (N1, N3 и N7) обладают заметно выраженными основными свойствами, что позволяет в сильнокислой среде Ad образовывать катион $H_3(Ad)^{3+}$ [15]. Донорные атомы азота можно расположить в ряд по уменьшению их основности: N1 > N7 > N3, но из-за таутомерии, при протонировании молекулы Ad в водном растворе до иона $H(Ad)^+$ статистическое распределение протона по атомам азота будет следующим: 96 % для формы $N7(Ad)N1 \cdot H^+$, 3,2 % для $^+H \cdot N7(Ad)N1$, и 0,7 % мольн. для $^+H \cdot N3(Ad)N1, N7$ [15]. В водном растворе слабой полимерной кислоты ПВП-КК, сравнимой по силе с уксусной кислотой (pKa 4,76), наиболее вероятен вариант образования слабого молекулярного комплекса [(ПВП-КК) ··· H^+ ··· Ad], возможно, дополнительно стабилизированного слабыми невалентными взаимодействиями между лактамным фрагментов ВП и пуриновым фрагментом Ad. Высказанное предположение косвенно подтверждается заметным увеличением растворимости Ad в растворах ПВП-КК относительно чисто водных растворов (при нейтральном уровне pH):

Подобный молекулярный комплекс способен выступать как своеобразное «депо» нахождения Ad в зоне поражения/регенерации и осуществлять постепенное освобождение Ad [5].

Комплексы металлов (координационные соединения, КС) достаточно активно используются в современной фармакологии, однако основной областью их использования являются цитостатические препараты ряда цисплатина [16]. Примеров усиления действия биологически активных соединений в присутствии КС чрезвычайно мало [17], однако их число постепенно растет. Например КС Cu(II) способны выступать как модуляторы фармакологической активности, запуская или активируя процессы клеточной регенерации [18] или Pt(II) – способные предотвращать инвазию и метастазирование раковых опухолей [19, 20]. В рамках данного исследования были использованы достаточно простые алаинатные комплексы меди(II) и цинка $M(Ala)_2$ с геометрией плоского квадрата, имеющие легкодоступные координационные сайты и способные легко ввзаимодействовать с молекулами-лигандами. Выбор центральных ионов металлов комплексов обусловлен ролью ионов меди и цинка в составе комплексов с аминокислотами в активации процессов регенерации тканей [21–23].

Как правило, наиболее широкоприменяемые современные препараты лечения ожоговых травм, в качестве активных компонентов содержат комбинацию из антиоксиданта, противомикробного компонента и препарата, ускоряющего процессы регенерации тканей (таблица 1). В качестве антиоксиданта – ингибитора радикальных процессов используют производные фенола: парабены (alkyl *p*-hydroxybenzoates), бутилгидрокситолуен (ионол, агидол-1,2,6-ди-*трет*-бутил-4-метил-фенол) и бутилгидроксианизол (BHA, смесь 2-*трет*-бутил-4-гидроксианизола и 3-*трет*-бутил-4-гидроксианизола) [24]. В настоящее время проявляется интерес к дигидрокверцетину, как к сильному антиоксиданту естественного происхождения и, одновременно – соединению, стимулирующему синтез и стабилизацию структуру волокон коллагена к тканях [25].

Основными препаратами ускоряющими процессы регенерации тканей, применяемыми при лечении ожоговых травм является дексапантенол, препараты облепихового масла (содержащего сумму каротиноидов, дополнительно проявляющего еще противовоспалительные и антибактериальные свойства [27]), метилурацил и препараты ультрафильтратов телячьей крови (Солкосерил®, Актовегин®) [26]. Однако последние состоят из более 200 отдельных соединений и, вероятно наиболее эффективны, как нейропротекторы. При этом многие авторы указывают на их недоказанную клиническую эффективность [28] и они запрещены к применению в США, Канаде и Евросоюзе.

Целью данного исследования явилась оценка ранозаживляющего действия новых субстанций на основе систем, содержащих координационные соединения меди(II) или цинка с молекулярным комплексом «аденозин-полимер» на основе сополимера винилпирролидона в сравнении с препаратом Депантол® (крем на основе дексапантенола с хлоргексидином, АО «Нижфарм», Россия) на модели термического ожога у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез исследуемых соединений

CHN полученных соединений проводили на элементном анализаторе LECO CHNS(O)-932. ИК-спектры образцов регистрировались на приборах IRAffinity-1 (Shimadzu, Япония) (методом таблетирования образца с KBr) и IRTracer-100 (Shimadzu, Япония), оснащенном приставкой НПВО Specac Quest (Shimadzu Corporation, Япония). Потенциометрические измерения проводились на анализаторе PP-20 (Sartorius AG, Германия).

Таблица 1. Состав некоторых препаратов, используемых для лечения ожоговых травм [24]

Table 1. Composition of some diseases, treatment for the treatment of burn injuries [24]

Название (лек. форма) Name (dosage form)	**Действующее вещество** Active substance	**Вспомогательные вещества** Excipients
Пантенол (мазь) Panthenol (ointment)	дексапантенол, метилпарабен dexpanthenol, methylparaben	вазелин, ланолин, парафин жидкий, воск эмульсионный, цетостеариловый спирт, вода petroleum jelly, lanolin, liquid paraffin, emulsion wax, cetostearyl alcohol, water
Бепантен плюс (мазь) Bepanten plus (ointment)	декспантенол, хлоргексидина гидрохлорид dexpanthenol, chlorhexidine hydrochloride	пантолактон, цетиловый спирт, стеариловый спирт, ланолин, парафин белый мягкий, парафин жидкий, макрогола стеарат, вода pantolactone, cetyl alcohol, stearyl alcohol, lanolin, white soft paraffin, liquid paraffin, macrogol stearate, water
Олазоль (аэрозоль) Olazol (aerosol)	облепиховое масло, левомицетин, борная кислота sea buckthorn oil, chloramphenicol, boric acid	триэтаноламин, ланолин, стеариновая кислота, глицерин, вода triethanolamine, lanolin, stearic acid, glycerin, water
Радевит(мазь) Radevit (ointment)	ретинола пальмитат (вит. А), α-токоферола ацетат (вит. Е), колекальциферол (вит. D), бутилгидрокситолуен бутилгидроксианизол retinol palmitate (vit. A), α-tocopherol acetate (vit. E), colecalciferol (vit. D), butylhydroxytoluene, butylhydroxyanisole	воск эмульсионный, вазелиновое масло, глицерин, этанол, вода emulsion wax, vaseline oil, glycerin, ethanol, water
Солкосерил (мазь) Solcoseryl (ointment)	депротеинизированный диализат из крови здоровых молочных телят [27], метилпарабен, пропилпарабен deproteinized dialysate from the blood of healthy dairy calves [27], methylparaben, propylparaben	цетиловый спирт, холестерол, вазелин белый, вода cetyl alcohol, cholesterol, white petrolatum, water
Солкосерил (гель) Solcoseryl (gel)	депротеинизированный диализат из крови здоровых молочных телят [27], пропилпарабен deproteinized dialysate from the blood of healthy dairy calves [27], propylparaben	пропиленгликоль, натрия кармеллоза, лактат кальция, вода propylene glycol, carmellose sodium, calcium lactate, water
Левомеколь (мазь) Levomekol (ointment)	метилурацил, левомицетин methyluracil, chloramphenicol	ПЭГ-1500, ПЭГ-400 PEG-1500, PEG-400

$Cu(Ala)_2 \cdot H_2O$ (Ala – алаинат-анион) был синтезирован по модифицированной методике, описанной в [29]. В холодный раствор 3,34 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (13,4 ммоль) в 135 мл воды быстро приливали раствор 1,1 г (27,6 ммоль) гидроксида натрия в 17 мл воды. Выпавший осадок гидроксида меди(II) обильно промыли ледяной дистиллированной водой на воронке Бюхнера и переносили в стакан, содержащий 2,4 г (27,0 ммоль) L-аланина в 20 мл воды. Нагретый до 60–70 °C реакционный раствор фильтровали и упаривали на роторном испарителе до начала кристаллизации комплекса. Темно-голубые призматические кристаллы. Выход ~60 %. Найдено H – 5,6 %; C – 27,6 %; N – 10,8 %. Вычисленно для $C_6H_{14}CuN_2O_5$: H – 5,5 %; C – 28,0 %; N – 10,9 %. ИК: 627,5; 657,7; 895,8; 977,4; 1023,5; 1079,8; 1137,1; 1164,9; 1273,0; 1295,6; 1327,5; 1381,2; 1425,1; 1461,2; 1473,1; 1552; 1562,4; 1653; 3315,6.

$Zn(Ala)_2$ был синтезирован по модифицированной методике, описанной в [30], медленной кристаллизацией из раствора, содержащего эквимолярные количества L-аланина и $ZnSO_4 \cdot 9H_2O$ (2:1) в присутствии небольших количеств $Ca(OH)_2$ при 35 °C. Крупные бесцветные пластинчатые кристаллы. Выход ~40 %. Найдено H – 5,2 %; C – 29,6 %; N – 11,4 %. Вычислено для $C_6H_{12}N_2O_4Zn$: H – 5,0 %; C – 30,0 %; N – 11,7 %. ИК: 402,3; 539,1; 576,1; 654,1; 847,6; 886,2; 945,3; 991,4; 1064,6; 1158,1; 1263,2; 1294,2; 1334,5; 1390,0; 1466,1; 1511,0; 1579,0; 1633,0; 2208,3; 2884,2.

ПВП-КК сополимер N-винилпирролидона (ВП) с кротоновой кислотой (КК) (см. рисунок 1) был получен термической полимеризацией компонентов в присутствии 2,2′-азо-бис-изобутиронитрила, как инициатора в диоксановом растворе аналогично методу, описанному в [31]. Полимер выделен высаливанием диэтиловым эфиром и очищен диализом против воды. ММ 12500 Да, мольное соотношение ВП : КК = 91 : 9 (кондуктометрическое титрование NaOH). ИК: 479,8; 575,2; 650,3; 735,8; 845,4; 995,3; 1065,4; 1213,2; 1291,3; 1375,2; 1424,5; 1464,6; 1495,2; 1675,0; 2961,0.

Растворы препаратов были приготовлены по общей методике: навеску 1 г сополимера ВП-КК вносили в 10 г ПЭГ-400 (ПЭГ) при нагревании, отдельно 1 г аденозина (Ad) диспергировали в 10 мл дистиллированной воды и при перемешивании подкисляли конц. HCl до полного растворения (pH реакционной системы ~7) последнего. Далее в растворе аденозина растворяли необходимое количество соответствующего комплекса меди(II) или цинка. Полученные

растворы сополимера и аденозина смешивались. В случае выпадения осадка растворы подкислялись концентрированной соляной кислотой при перемешивании до его полного растворения. Во всех случаях pH полученных препаратов составлял 7.0–7.1. В полученных образцах мольное соотношение ПВП-КК : Ad : комплекс составляло 100 : 10 : 1, при массовой доле Ad порядка 5 % масс.

Изучение ранозаживляющего действия субстанций

Исследование проведено на 63 белых беспородных мышах-самцах массой 19,0 ± 1,0 г на момент начала эксперимента, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово». Содержание, кормление и выведение животных из эксперимента соответствовало требованиям ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Все манипуляции, проводимые с животными, были согласованы биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ, протокол № MICE-AD-21 от 12.01.2021.

Животные были рандомизированы по массе на 7 групп по 9 особей в каждой. В ходе эксперимента перед моделированием ожога в крестцовой и хвостовой областях у мышей была выбрита шерсть, затем наркотизированным животным (смесью препаратов Золетил – Ксилазин) раскаленным круглым предметом (диаметром 19,5 мм), наносился ожог на кожу в течение 1 минуты [32].

Пораженный участок оценивался и измерялся при помощи микрометра. Синтезированные средства наносили на поврежденный участок кожи в объеме по 0,1 мл, каждой особи, ежедневно в течение 4 недель (таблица 2).

Таблица 2. Состав исследуемых соединений

Table 2. Composition of the studied compounds

№ группы Group No.	**Обозначение препарата** Designation of the drug	**Состав препарата, % масс** The composition of the drug % mass	
1	ИВС 3А IVS 3A	ПВП-КК Ad ПЭГ Вода $Cu(Ala)_2$ PVP-KK Adenosine PEG Water $Cu(Ala)_2$	5 5 50 40 5 5 50 40
2	ИВС 4 IVS 4	ПВП-КК Ad ПЭГ вода $Zn(Ala)_2$ PVP-KK Adenosine PEG water $Zn(Ala)_2$	5 5 50 40 5 5 50 40
3	Депантол® Dexpanthenol®	Декспантенол Хлоргексидина биглюконат Пропиленгликоль Макрогола цетостеарат Цетостеариловый спирт* Парафин жидкий Вазелин $Na_2HPO_4 \cdot 10H_2O$ KH_2PO_4 Вода Dexpanthenol Chlorhexidine bigluconate Propylene glycol Macrogol cetostearate Cetostearyl alcohol* liquid paraffin Vaseline $Na_2HPO_4 \cdot 10H_2O$ KH_2PO_4 Water	5,25 0,15 10 1,6 5,4 10 10 0,02 0,78 56,8 5.25 0.15 10 1.6 5.4 10 10 0.02 0.78 56.8
4	ИВС 4А IVS 4A	ПВП-КК Ad ПЭГ Вода $Zn(Ala)_2$ PVP-KK Adenosine PEG Water $Zn(Ala)_2$	4 4 40 52 4 4 40 52
5	ИВС 1А IVS 1A	ПВП-КК ПЭГ Вода PVP-KK 5 PEG 50 Water 45	5 50 45 5 50 45
6	ИВС 2А IVS 2A	ПВП-КК Ad ПЭГ Вода PVP-KK 5 Adenosine 5 PEG 50 Water 40	5 5 50 40 5 5 50 40
7	Контроль Control		

Примечание. * Смесь цетилового (<60 %) и стеарилового спирта (>40 % масс).

Note. * Mixture of cetyl (<60 %) and stearyl alcohol (>40 % by weight).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате моделирования ожогового поражения у животных всех групп сформировался стандартизированный термический ожог кожи III степени, характеризующийся распространением на нижележащие мышцы. Зона повреждения плотная, нечувствительная к болевым раздражителям, образовался рыхлый, неравномерный по толщине струп [33]. Динамика заживления ожога оценивалась рассчетом площади зоны повреждения, данные динамики заживления отображены в таблицах 3, 4 (рисунок 2).

Таблица 4. Динамика уменьшения зоны повреждения

Table 4. Damage zone reduction dynamics

№ группы Group No.	Размер площади ожога, % Burn area size, %			
	1 неделя Week 1	2 неделя Week 2	3 неделя Week 3	4 неделя Week 4
1. ИВС 3А 1. IVS 3A	100	86	69	50
2. ИВС 4 2. IVS 4	100	91	87	81
3. Депантол 3. Dexpanthenol	100	55	39	21
4. ИВС 4А 4. IVS 4A	100	88	78	66
5. ИВС 1А 5. IVS 1A	100	91	80	69
6. ИВС 2А 6. IVS 2A	100	86	75	56
7. Контроль 7. Control	100	95	89	84

В ходе эксперимента самая высокая смертность была отмечена в контрольной группе, не получавшей

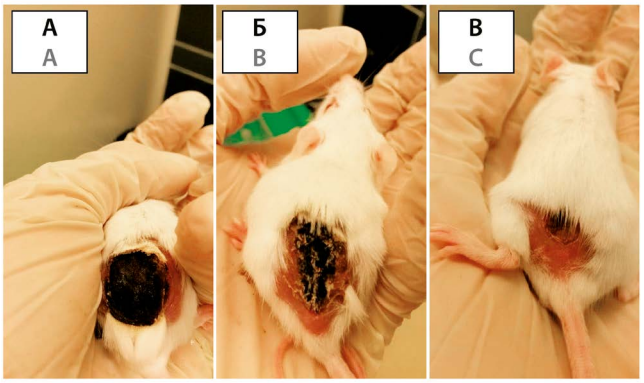


Рисунок 2. Динамика заживления.

А – смоделированный ожог; Б – струп плотный, сухой, повреждена подкожная клетчатка; В – сужение площади ожога, регенерация

Figure 2. Dynamics of healing.

A – simulated burn; B – dense scab, dry, damaged subcutaneous tissue; C – narrowing of the burn area, regeneration

терапию, наименьшая – в группе № 4, получавшей препарат ИВС 4А, которая сопоставима с группой № 3, получавшей препарат сравнения.

Гистологическое исследование

Полученные ткани были помещены в 10%-й забуференный формалин и фиксировались в течение 24 ч. Образцы тканей подвергались стандартной гистологической проводке в гистопроцессоре Excelsior AS (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), после чего происходила заливка в парафин и микротомия с использованием ротационного микротома. Срезы тол-

Таблица 3. Оценка динамики заживления ожогов по площади

Table 3. Evaluation of the dynamics of healing of burns by area

№ группы препарат Group no. drug	Площадь повреждения,мм² Damage area, mm²				Выживаемость, % Survival, %
	1 неделя Week 1	2 неделя Week 2	3 неделя Week 3	4 неделя Week 4	
1. ИВС 3А 1. IVS 3A	292,25 ± 10,20	250,87 ± 11,99	203,88 ± 23,05	148,06 ± 32,48	67
2. ИВС 4 2. IVS 4	303,11 ± 7,43	276,93 ± 7,99	262,18 ± 10,34	244,26 ± 13,49	66
3. Депантол 3. Dexpanthenol	298,52 ± 9,29	164,10 ± 20,96	116,91 ± 19,65	61,52 ± 21,81	88
4. ИВС 4А 4. IVS 4A	292,26 ± 7,82	257,6 ± 2,93	226,55 ± 12,74	193,1 ± 22,33	88
5. ИВС 1А 5. IVS 1A	293,64 ± 10,50	268,52 ± 9,55	237,72 ± 13,35	204,8 ± 27,16	66
6. ИВС 2А 6.IVS 2A	294,16 ± 7,82	255,62 ± 4,78	221,41 ± 13,61	164,58 ± 26,24	66
7. Контроль 7. Control	292,76 ± 9,01	282,81 ± 11,43	264,97 ± 6,39	249,54 ± 7,71	44

Таблица 5. Обобщенная балльная характеристика ожогового процесса

Table 5. Generalized score characteristics of the burn process

№ группы Group No.	Ширина рубцовой ткани Scar tissue width	Глубина распространения рубца Depth of the scar	Выраженность воспалительной инфильтрации рубцовой ткани The severity of inflammatory infiltration scar tissue	Выраженность гемосидероза The severity of hemosiderosis	Наличие изъязвления Presence of ulceration
1. ИВС 3А 1. IVS 3A	10	9	3	1	0
2. ИВС 4 2. IVS 4	10	11	10	4	2
3. Депантол 3. Dexpanthenol	16	14	7	2	0
4. ИВС 4А 4. IVS 4A	17	16	13	4	0
5. ИВС 1А 5. IVS 1A	15	13	10	3	0
6. ИВС 2А 6. IVS 2A	14	15	8	0	0
7. Контроль 7. Control	9	9	8	4	1

щиной 3–3,5 мкм помещались на предметные стекла, окрашивались гематоксилином и эозином. Аналитический этап работы проводился с использованием проходящего света и микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) (рисунок 3).

В таблице 5 представлены обобщенные балльные характеристики, включающие оценку ширины и глубины образующейся рубцовой ткани, выраженности воспалительной инфильтрации и наличие гемосидероза в тканях.

Группа № 1 (ИВС 3А)

Во всех случаях наблюдается образование рубцовой ткани. Наиболее выраженные изменения в данной группе определялись у одной особи и были представлены широким, умеренно глубоким рубцом со слабовыраженной инфильтрацией и очаговым гемосидерозом. Минимальное распространение фиброзной ткани определялось у нескольких животных в группе, в остальных случаях распространение рубцовой ткани можно оценить как умеренное. Слабовыраженная воспалительная инфильтрация так же присутствует у двух особей, в остальных случаях она не определяется или минимальна.

Группа № 2 (ИВС 4)

В группе во всех случаях наблюдается образование рубцовой ткани. Наиболее выраженные изменения в группе определялись как обширный язвенно-некротическим дефект, с распространением рубцовой ткани до кости. В нескольких случаях изменения умеренно выраженные, эпидермис сохранен. Слабовыраженный гемосидероз определяется у всех.

Группа № 3 (Депантол®)

Во всех случаях отмечалось образование рубцовой ткани, распространяющаяся на подкожно-жировую клетчатку. Наиболее выраженные изменения определяются у двух особей, где отмечалась рубцовая ткань с умеренно выраженной инфильтрацией, и большой по площади рубец. Минимальные изменения представлены у нескольких особей, где инфильтрация рубцовой ткани не определялась или была минимальна.

У всех остальных площадь фиброзной ткани определялась как умеренная (за исключением обширного рубца у одной особи) и в ней определяется слабовыраженная инфильтрация. Умеренно выраженный гемосидероз присутствует только у одной особи. Целостность эпидермиса сохранена у всех подопытных животных.

Группа № 4 (ИВС 4А)

Во всех случаях в группе отмечалось наличие рубцовой ткань. Самые выраженные изменения присутствуют у четырех особей и представлены обширными рубцами, распространяющимися глубже подкожно-жировой клетчатки, и умеренно выраженной воспалительной инфильтрацией (отмечалось присутствие очаговой нейтрофильной инфильтрации). Минимальные изменения определялись у двух особей, в виде небольшого участка фиброзной ткани в пределах дермы и с минимальной инфильтрацией. У одной из особей изменения оцениваются как умеренно выраженные. Слабовыраженный гемосидероз определялся у четырех особей, у остальных гемосидероз не наблюдался.

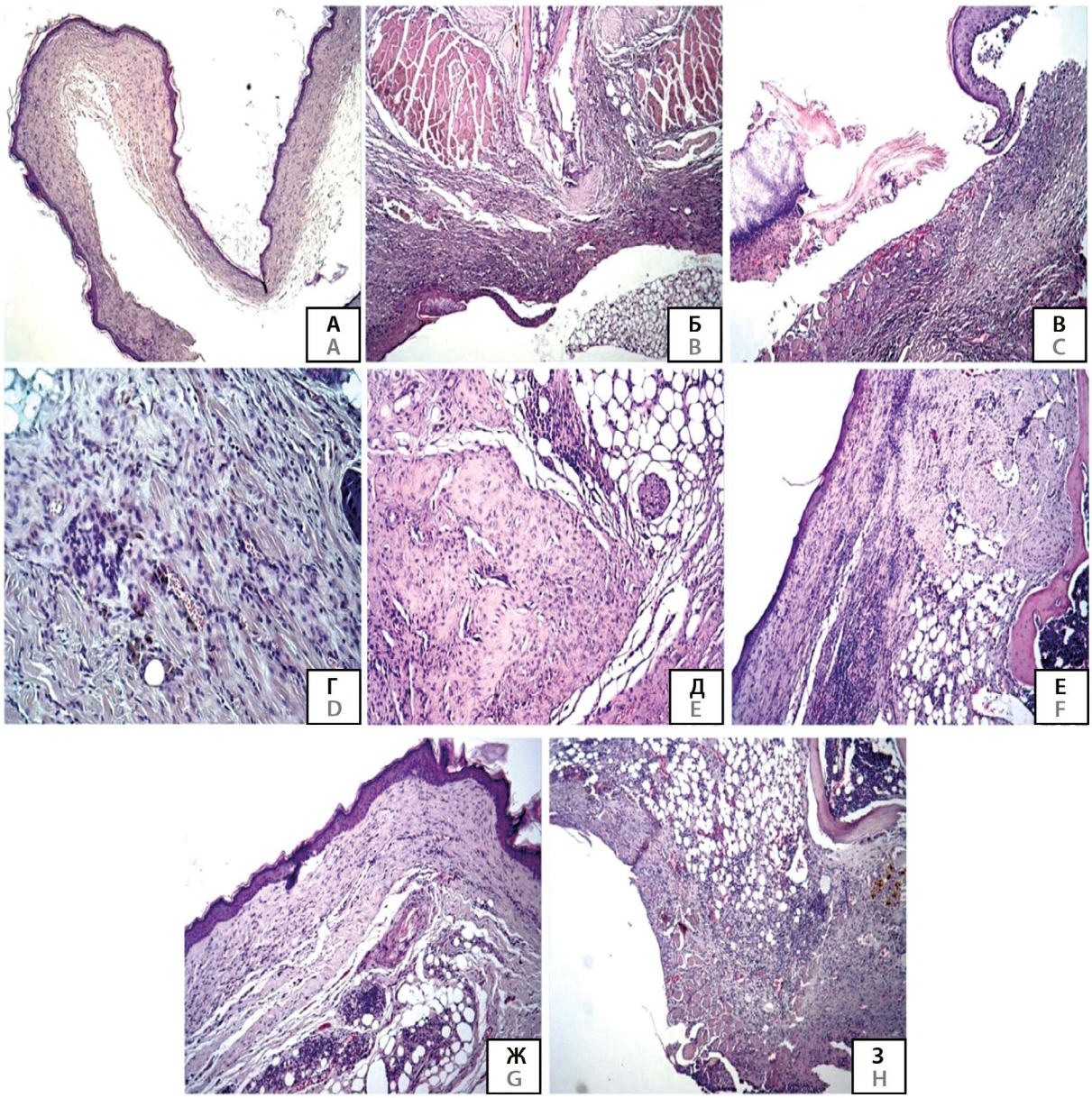


Рисунок 3. Гистологическое исследование при окраске гематоксилином и эозином:

А – крупноочаговый фиброз кожи; Б – крупноочаговый фиброз кожи, язвенно-некротический дерматит; В – язвенно-некротический дерматит; Г – крупноочаговый фиброз кожи, умеренно выраженный гемосидероз; Д–Ж – крупноочаговый фиброз кожи с умеренно выраженной воспалительной инфильтрацией; З – язвенно-некротический дерматит, крупноочаговый фиброз кожи, очаговый гемосидероз

Figure 3. Histological examination with hematoxylin and eosin staining:

A – macrofocal skin fibrosis; B – macrofocal skin fibrosis, ulcerative necrotic dermatitis; C – ulcerative necrotic dermatitis; D – macrofocal skin fibrosis, moderate hemosiderosis; E–G – macrofocal skin fibrosis with moderate inflammatory infiltration; H – ulcerative necrotic dermatitis, macrofocal skin fibrosis, focal hemosiderosis

Группа № 5 (ИВС 1А)

Во всех случаях наблюдаются обширные участки рубцовой ткани. Наиболее выраженные изменения определялись в одном случае, где рубец с выраженной воспалительной инфильтрацией распространялся до кости. Остальные случаи характеризовались умеренно выраженной инфильтрацией фиброзной ткани. Слабовыраженный гемосидероз определялся у троих особоей, а у остальных он не наблюдается.

Группа № 6 (ИВС 2А)

В группе во всех случаях отмечалось наличие рубцовой ткани. Наиболее выраженные изменения характеризовались обширным и глубоким распространением фиброзной ткани с выраженной очаговой нейтрофильноклеточной инфильтрацией.

В большинстве случаев изменения отмечались как умеренные. Гемосидероз в группе не наблюдается.

Группа № 7 (Контроль)

Во всех случаях группы участки рубцовой ткани обширны и распространяются до кости. Наиболее выраженные выявлены в виде язвенно-некротического дефекта с преимущественно нейтрофильноклеточной выраженной инфильтрацией рубцовой ткани. У всех особей отмечался слабовыраженный гемосидероз, а в одном случае умеренно выраженный очаговый гемосидероз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные водные субстанции на основе молекулярного комплекса сополимер поливинилпирролидона-аденозин, содержащие координационные соединения, показали умеренное ранозаживляющее действие на экспериментальной модели термического ожога в сравнение с препаратом Депантол®, основанным на водо-жировой эмульсии. Субстанции ИВС 3А [содержит в составе $Cu(Ala)_2$] и ИВС 2А (не содержит КС), показали лучшую эффективность в отношении динамики заживления ожогов в сравнении со другими исследуемыми субстанциями, что сочеталось с низкой смертностностью экспериментальных животных в данных группах (3 случая и 2 случая из 9 особей, соответственно). Препарат сравнения Депантол®, в свою очередь, показал самый лучший результат, вероятно обуславленный наличием в его составе противомикробного компонента. Возможно, несколько заниженные результаты серии экспериментальных препаратов относительно препарата сравнения объясняются их чисто водной природой, не обеспечивающей поддержания необходимого уровня увлажнения раны и отсутствием противомикробных компонентов в их составе. Синтезированные комплексы показали результаты, близкие к препарату сравнения по динамике заживления, гистологическому анализу и выживаемости.

Экспериментальные субстанции, основанные на водных растворах МК аденозина-полимер, показали умеренный ранозаживляющий эффект, сопоставимый с референтным лекарственным средством, что представляет достаточный интерес для дальнейшего изучения подобных композиций, или их модифицированных составов с добавлением противомикробных компонентов на экспериментальных моделях термического ожога, с целью создания новых, более эффективных лекарственных препаратов для заживления раневых поверхностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роуз Л. Х. Раны. Диагностика и лечение. Атлас-справочник. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2021. 536 с.
2. Jeschke M. G., van Baar M. E., Choudhry M. A., Chung K. K., Gibran N. S., Logsetty S. Burn injury. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1). DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5.
3. Janos C.-D., Gallagher J. J., Norbury W. B., Finnerty C. C, Herndon D. N., Culnan D. M. Treatment of Infection in Burn Patients. *Total Burn Care*. 2018;4:93–113. DOI: 10.1016/B978-0-323-47661-4.00011-3.
4. Панарин Е. Ф., Лавров Н. А., Соловский М. В., Шальнова Л. И. Полимеры – носители биологически активных веществ. СПб: ЦОП «Профессия»; 2014. 304 с.
5. Панарин Е. Ф. Полимерные лекарства и биологически активные вещества. *Полимеры и медицина*. 2005;1:20–24.
6. Афиногенов Г. Е, Панарин Е. Ф. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ; 1993. 264 с.
7. Cui D., Gāo A., Liang H., Tian J., Li X., Shen Q. Nano coronavirus recombinant vaccine taking graphene oxide as carrier. Chinese patent CN202011031367.1A. 27.09.2020. Available at: https://patents.google.com/patent/CN112220919A/en. Accessed: 20.04.2022.
8. Veronese F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*. 2001;22(5):405–417. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00193-9.
9. Porfiryeva N. N. , Moustafine R. I. , Khutoryanskiy V. V. PEGylated Systems in Pharmaceutics. *Polymer Science, Series C*. 2020;62(1):62–74. DOI: 10.1134/S181123822001004X.
10. Nelson D. L., Cox M. M. Principles of Biochemistry (4th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. 2000. 1120 p. DOI: 10.1007/978-3-662-08289-8.
11. Невская К. В. Роль модифицированных аденозином моноцитов в репаративной регенерации кожи при ожоговой травме. Дис. ... канд. мед. наук. Томск. 2015. Доступно по: http://medical-diss.com/medicina/rol-modifitsirovannyh-adenozinom-monotsitov-v-reparativnoy-regeneratsii-kozhi-pri-ozhogovoy-travme. Ссылка активна на 20.04.2022.
12. Звягинцева Т. В., Халин И. В. Метаболитотропная терапия хронических ран. СПб: ФОП Вировець А. П.; 2011. 183 с.
13. Haskó G. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):33–39. DOI: 10.1016/j.it.2003.11.003.
14. Kapinos L. E., Operschall B. P., Larsen E., Sigel H. Understanding the Acid-Base Properties of Adenosine: The Intrinsic Basicities of N1, N3 and N7. *Chemistry – A European Journal*. 2011;17(29):8156–8164. DOI: 10.1002/chem.201003544.
15. Lippert B. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Weinheim: Wiley-VCH. 2006. 576 p.
16. Marlin R., Balasubramaniyan S., Govindharaju R., Meenakshi V. M., Jayalakshmi B., Ramachandramoorthy T. Synthesis, spectral characterization and biopotential significance of Co (II) and Ni (II) complexes with biologically active ligands. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2020;12(1):22–28. DOI: 10.25004/IJPSDR.2020.120104.
17. Rajalakshmi S., Vimalraj S., Saravanan S., Preeth D. R., Shairam M., Anuradha D. Synthesis and characterization of silibinin/phenanthroline/neocuproine copper(II) complexes for augmenting bone tissue regeneration: an in vitro analysis. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2018;23(5):753–762. DOI: 10.1007/s00775-018-1566-4.
18. Gumireddy K., Li A., Cao L., Yan J., Liu L., Xu X., Pazoles C., Huang Q. NOV-002, A Glutathione Disulfide Mimetic, Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. 2013;S7:1–6. DOI: 10.4172/2157-2518.s7-002.
19. Jenderny S., Lin H., Garrett T., Tew K. D., Townsend D. M. Protective effects of a glutathione disulfide mimetic (NOV-002) against cisplatin induced kidney toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010;64(1):73–76. DOI: 10.1016/j.biopha.2009.09.009.
20. Warra A. A. Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics – A Review. *J. Chem. Pharm. Res*. 2011;3(4):951–958.
21. Mazurowska L., Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. *Journal of Cosmetic Science*. 2008;59(1):59–69.
22. Abendrot M., Kalinowska-Lis U. Zinc-containing compounds for personal care applications. *International Journal of Cosmetic Science*. 2018;40:319–327. DOI: 10.1111/ics.12463.
23. Толмачевой Е. А., ред. Видаль-2021. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. 2021. М.: Видаль Рус. 2021. 1120 с.
24. Терехов Р. П., Селиванова И. А., Анурова М. Н., Жевлакова А. К., Никитин И. Д., Цонг Ж., Ма С., Янг Ф., Донг Ж., Ляо Й. Сравнительное изучение ранозаживляющих свойств псевдополиморфных модификаций дигидрокверцетина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020;10:452–456. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-452-456.

25. Machicao F., Muresanu D. F., Hundsberger H. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. *Journal of the Neurological Sciencesruen.* 2012;322(1–2):222–227. DOI: 10.1016/j.jns.2012.07.069.
26. Koskovac M., Cupara S., Kipic M., Barjaktarevic A., Milovanovic O., Kojicic K., Markovic M. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals. *Cosmetics*. 2017;4(4):40. DOI: 10.3390/cosmetics4040040.
27. Уваров Д. А. Анализ структуры государственных закупок лекарственных средств с недоказанной эффективностью. *Электронный вестник*. 2020;80:86–107. DOI: 10.24411/2070-1381-2020-10065.
28. Calvo R., Sartoris R. P., Calvo H. L., Chagas E. F., Rapp R. E. Antiferromagnetic spin chain behavior and a transition to 3D magnetic order in Cu(D,L-alanine) 2 : Roles of H-bonds. *Solid State Sciences*. 2016;55:144–151. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2016.03.005.
29. Priya A. P., Srinivasan V., Subhashini R., Vijayalakshmi A. Synthesis and physicochemical properties of a promising nonlinear optical metal organic crystal: Bis(L-alaninato)zinc(II). *Materials Letters*. 2020;266:127474. DOI: 10.1016/j.matlet.2020.127474.
30. Борисенко М. С. Водорастворимые реакционноспособные сополимеры N-винилпирролидона и сополимеры акриловой кислоты с 2-оксиэтилметакрилатом как носители противотуберкулёзных препаратов. Дисс. ... канд. хим. наук. Санкт-Петербург; 2019. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/vodorastvorimye-reaktsionnosposobnye-sopolimery-n-vinilpirrolidona-i-sopolimery-akrilovoi. Ссылка активна на 20.04.2022.
31. Abdullahi A., Amini-Nik S., Jeschke, M. G. Cellular and Molecular Life Sciences. *Animal models in burn research*. 2014;71(17):3241–3255.
32. Kordestani S. S. Atlas of wound Healing. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2019. 180 p. DOI: 10.1016/C2018-0-03292-2.
33. Brownson E. G., Gibran N. S., Heimbach D. M. Evaluation of the burn wound: management decisions. In: Total Burn Care. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2018. 87-92 p.

REFERENCES

1. Rose L. H. Wounds. Diagnosis and treatment. Atlas-reference book. Moscow: GEPTAR-Media; 2021. 538 p. (In Russ.)
2. Jeschke M. G., van Baar M. E., Choudhry M. A., Chung K. K., Gibran N. S., Logsetty S. Burn injury. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1). DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5.
3. Janos C.-D., Gallagher J. J., Norbury W. B., Finnerty C. C, Herndon D. N., Culnan D. M. Treatment of Infection in Burn Patients. *Total Burn Care*. 2018;4:93–113. DOI: 10.1016/B978-0-323-47661-4.00011-3.
4. Panarin E. F., Lavrov N. A., Solovskii M. V., Shalnova L. I. Polymers are carriers of biologically active substances. St. Petersburg: COP "Professiya". 2014. 304 p. (In Russ.)
5. Panarin E. F. Polymer drugs and biologically active substances. *Polymers and medicine*. 2005;1:20–24. (In Russ.)
6. Afinogenov G. E., Panarin E. F. Antimicrobial polymers. St. Petersburg: Gippokrat. 1993. 264 p. (In Russ.)
7. Cui D., Gāo A., Liang H., Tian J., Li X., Shen Q. Nano coronavirus recombinant vaccine taking graphene oxide as carrier. Chinese patent CN202011031367.1A. 27.09.2020. Available at: https://patents.google.com/patent/CN112220919A/en. Accessed: 20.04.2022.
8. Veronese F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*. 2001;22(5):405–417. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00193-9.
9. Porfiryeva N. N. , Moustafine R. I. , Khutoryanskiy V. V. PEGylated Systems in Pharmaceutics. *Polymer Science, Series C*. 2020;62(1):62–74. DOI: 10.1134/S181123822001004X.
10. Nelson D. L., Cox M. M. Principles of Biochemistry (4th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. 2000. 1120 p. DOI: 10.1007/978-3-662-08289-8.
11. Nevskaya K. V. The role of adenosine-modified monocytes in reparative skin regeneration in burn injury. [Dissertation.] Tomsk. 2015. Available at: http://medical-diss.com/medicina/rol-modifitsirovannyh-adenozinom-monotsitov-v-reparativnoy-regeneratsii-kozhi-pri-ozhogovoy-travme. Accessed: 20.04.2022. (In Russ.)
12. Zvyagintseva T. V., Khalin I. V. Metabolitotropic therapy of chronic wounds. St. Petersburg: FOP Virovec' A. P.; 2011. 183 p. (In Russ.)
13. Haskó G. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):33–39. DOI: 10.1016/j.it.2003.11.003.
14. Kapinos L. E., Operschall B. P., Larsen E., Sigel H. Understanding the Acid-Base Properties of Adenosine: The Intrinsic Basicities of N1, N3 and N7. *Chemistry – A European Journal*. 2011;17(29):8156–8164. DOI: 10.1002/chem.201003544.
15. Lippert B. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Weinheim: Wiley-VCH. 2006. 576 p.
16. Marlin R., Balasubramaniyan S., Govindharaju R., Meenakshi V. M., Jayalakshmi B., Ramachandramoorthy T. Synthesis, spectral characterization and biopotential significance of Co (II) and Ni (II) complexes with biologically active ligands. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2020;12(1):22–28. DOI: 10.25004/IJPSDR.2020.120104.
17. Rajalakshmi S., Vimalraj S., Saravanan S., Preeth D. R., Shairam M., Anuradha D. Synthesis and characterization of silibinin/phenanthroline/neocuproine copper(II) complexes for augmenting bone tissue regeneration: an in vitro analysis. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2018;23(5):753–762. DOI: 10.1007/s00775-018-1566-4.
18. Gumireddy K., Li A., Cao L., Yan J., Liu L., Xu X., Pazoles C., Huang Q. NOV-002, A Glutathione Disulfide Mimetic, Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. 2013;S7:1–6. DOI: 10.4172/2157-2518.s7-002.
19. Jenderny S., Lin H., Garrett T., Tew K. D., Townsend D. M. Protective effects of a glutathione disulfide mimetic (NOV-002) against cisplatin induced kidney toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010;64(1):73–76. DOI: 10.1016/j.biopha.2009.09.009.
20. Warra A. A. Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics – A Review. *J. Chem. Pharm. Res*. 2011;3(4):951–958.
21. Mazurowska L., Mojski M. Biological activities of selected peptides: skin penetration ability of copper complexes with peptides. *Journal of Cosmetic Science*. 2008;59(1):59–69.
22. Abendrot M., Kalinowska-Lis U. Zinc-containing compounds for personal care applications. *International Journal of Cosmetic Science*. 2018;40:319–327. DOI: 10.1111/ics.12463.
23. Tolmacheva E. A., ed. Vidal-2021. The Vidal Handbook. Medicines in Russia. 2021. Moscow: Vidal Rus. 2021. 1120 p. (In Russ.)
24. Terekhov R. P., Selivanova I. A., Anurova M. N., Zhevlakova A. K., Nikitin I. D., Tsong J., Ma S., Young F., Dong J., Liao Y. Comparative study of the wound healing properties of pseudopolymorphic modifications of dihydroquercetin. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020;10:452–456 (In Russ.) DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-452-456.
25. Machicao F., Muresanu D. F., Hundsberger H. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. *Journal of the Neurological Sciencesruen*. 2012;322(1–2):222–227. DOI: 10.1016/j.jns.2012.07.069.
26. Koskovac M., Cupara S., Kipic M., Barjaktarevic A., Milovanovic O., Kojicic K., Markovic M. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals. *Cosmetics*. 2017;4(4):40. DOI: 10.3390/cosmetics4040040.
27. Uvarov D. A. State Procurement Structure of Medicines with Unproved Efficiency. *Electronic Bulletin*. 2020;80:86–107. (In Russ.) DOI: 10.24411/2070-1381-2020-10065.
28. Calvo R., Sartoris R. P., Calvo H. L., Chagas E. F., Rapp R. E. Antiferromagnetic spin chain behavior and a transition to 3D magnetic order in Cu(D,L-alanine) 2 : Roles of H-bonds. *Solid State Sciences*. 2016;55:144–151. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2016.03.005.
29. Priya A. P., Srinivasan V., Subhashini R., Vijayalakshmi A. Synthesis and physicochemical properties of a promising nonlinear optical metal organic crystal: Bis(L-alaninato)zinc(II). *Materials Letters*. 2020;266:127474. DOI: 10.1016/j.matlet.2020.127474.
30. Borisenko M. S. Water-soluble reactive copolymers of N-vinylpyrrolidone and copolymers of acrylic acid with 2-hydroxyethyl methacrylate as carriers of anti-tuberculosis drugs. [Dissertation.] Saint Petersburg; 2019. Available at: https://www.dissercat.com/content/vodorastvorimye-reaktsionnosposobnye-sopolimery-n-vinilpirrolidona-i-sopolimery-akrilovoi. Accessed: 20.04.2022. (In Russ.)
31. Abdullahi A., Amini-Nik S., Jeschke, M. G. Cellular and Molecular Life Sciences. *Animal models in burn research*. 2014;71(17):3241–3255.
32. Kordestani S. S. Atlas of wound Healing. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2019. 180 p. DOI: 10.1016/C2018-0-03292-2.
33. Brownson E. G., Gibran N. S., Heimbach D. M. Evaluation of the burn wound: management decisions. In: Total Burn Care. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2018. 87-92 p.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ

Т. Н. Комаров[1]✉, П. К. Карнакова[1], О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], Н. С. Багаева[1], И. Е. Шохин[1], К. Я. Заславская[2], П. А. Белый[2]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
[2] ООО «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777;
О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. С. Щелгачева – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001;
Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630;
К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 22.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) – это острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Фавипиравир – синтетический противовирусный препарат, применяемый для этиотропной терапии COVID-19. Выпускается в лекарственных формах для перорального и парентерального введения, при этом парентеральный путь введения фавипиравира имеет ряд преимуществ перед пероральным. Разработка и валидация методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части клинического исследования препарата фавипиравира для парентерального введения в виде инфузий, изучения его фармакокинетических параметров и выбора оптимальных доз препарата.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием с использованием ультрафиолетового детектора (ВЭЖХ-УФ) для дальнейшего изучения фармакокинетики.

Материалы и методы. Определение фавипиравира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 323 ± 2 нм. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения метанолом. Внутренний стандарт: ралтегравир. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08%-го аммиака (элюент А); 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, 10%-й раствор воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08%-го аммиака (элюент В). Колонка: Phenomenex Kinetex®, C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм. Аналитический диапазон методики: 0,25–200,00 мкг/мл.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналита и внутреннего стандарта; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Заключение. Разработана и валидирована методика определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований препаратов фавипиравира

Ключевые слова: фавипиравир, COVID-19, плазма, ВЭЖХ-УФ, валидация, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, П. К. Карнакова, участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская и П. А. Белый отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):220–229. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229

Development and Validation of HPLC-UV Method for the Determination of Favipiravir in Human Plasma

Timofey N. Komarov[1]✉, Polina K. Karnakova[1], Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Natalia S. Bagaeva[1], Igor E. Shohin[1], Kira Ya. Zaslavskaya[2], Petr A. Bely[2]

[1] LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[2] LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

© Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А., 2022
© Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., 2022

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777;
Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dana S. Shchelgacheva – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001;
Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630;
Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 22.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Coronavirus disease (COVID-19) is an acute infectious disease caused by SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Favipiravir is a synthetic prodrug with antiviral activity used for the treatment of COVID-19. There are oral and parenteral dosage forms of favipiravir. Compared with oral administration, parenteral administration has some advantages. Developing a method for the determination of favipiravir in human blood plasma is necessary for performing the analytical part of clinical studies of favipiravir for parenteral administration as an infusion, studying pharmacokinetics, and choosing the optimal dosage of the drug.

Aim. The aim of this study is to develop and validate a method for quantitative determination of favipiravir in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of favipiravir in human plasma by HPLC-UV. The UV detection was set at 323 ± 2 nm. The samples were processed by methanol protein precipitation. Internal standard: raltegravir. Mobile phase: 0.1 % formic acid in water with 0.08 % aqueous ammonia (eluent A), 0.1 % formic acid in acetonitrile with 0.08 % aqueous ammonia (eluent B). Column: Phenomenex Kinetex®, C18, 150 × 4.6 mm, 5 µm. Analytical range: 0.25–200.00 µg/mL.

Results and discussion. This method was validated by selectivity, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

Conclusion. We developed and validated the method of quantitative determination of favipiravir in human plasma by HPLC-UV. The analytical range was 0.25–200.00 µg/mL in human plasma. The method could be applied in pharmacokinetics studies of favipiravir.

Keywords: favipiravir, COVID-19, plasma, HPLC-UV, validation, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Polina K. Karnakova have developed and validated the analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A. Determination of favipiravir in human plasma by HPLC-UV. *Drug development & registration*. 2022;11(3):220–229. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)] – это острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Данное заболевание, впервые зарегистрированное в Китае в декабре 2019 года, является причиной пандемии COVID-19, продолжающейся во всем мире в настоящее время [1]. Согласно статистическим данным, на август 2022 года в 228 странах мира зафиксировано около 578 млн случаев заражения вирусом SARS-CoV-2, из которых более 6 млн закончились летальным исходом. На территории России на сегодняшний день зарегистрировано более 18,5 млн случаев, а число летальных исходов достигло более 380 тысяч[1].

Появление новых штаммов вируса SARS-CoV-2, снижение темпов вакцинации, а также отмена действующих ранее ограничительных мер и сокращение мероприятий, направленных на снижение темпов распространения новой коронавирусной инфекции, могут провоцировать рост заболеваемости и повышать нагрузку на систему здравоохранения [2]. В настоящее время по всему миру наблюдается распространение штамма «Омикрон» и его разновидностей. Опасность данного штамма и его подштаммов заключается в наличии мутаций, вызывающих повышенную трансмиссивность, а также позволяющих избегать иммунного ответа от вакцин и естественного иммунитета [3, 4].

При лечении COVID-19 рекомендуется назначать пациентам поддерживающую патогенетическую, этиотропную, а также симптоматическую терапию. Согласно последней версии временных методических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции для этиотропной терапии COVID-19 в настоящее время выделяется несколько противовирусных препаратов, в том числе фавипиравир[2].

Фавипиравир – синтетический противовирусный препарат, аналог пуриновой нуклеиновой кислоты, селективный ингибитор РНК-полимеразы, прояв-

[1] WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: https://covid19.who.int/ Accessed: 07.08.2022.

[2] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 17.07.2022.

ляющий активность в отношении широкого спектра различных РНК-содержащих вирусов [5, 6]. В России зарегистрированы препараты фавипиравира для перорального, а также для парентерального введения[1]. Фавипиравир в лекарственной форме таблетки применяется как в амбулаторных, так и в стационарных условиях, а фавипиравир для парентерального применения – только в стационарных условиях и рекомендован пациентам с легким и среднетяжелым течением COVID-19[2]. Фавипиравир для парентерального введения удобен для пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии, а также для пациентов, которые имеют поражения желудочно-кишечного тракта или страдают дисфагией. Парентеральный путь введения имеет высокую биодоступность, а также помогает избежать взаимодействия с пищей и воздействия пищеварительных ферментов [7, 8].

Разработка и валидация методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части клинического исследования препарата фавипиравира в виде инфузий в различных дозах, изучения фармакокинетических параметров и выбора оптимальных доз препарата.

В настоящее время в литературных источниках опубликован ряд работ по разработке методик количественного определения фавипиравира с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения фавипиравира в биологических жидкостях применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV)], с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) [high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)], с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)].

В рассмотренных методиках в качестве пробоподготовки в основном применяется метод жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), а также осаждение белков плазмы крови органическими растворителями (изопропанолом, метанолом, ацетонитрилом) (таблица 1).

Проанализировав методики количественного определения фавипиравира, представленные в литературных источниках, был сделан вывод об отсутствии методик одновременно с простым способом пробоподготовки и широким аналитическим диапазоном, поэтому было принято решение разработать и валидировать методику, отвечающую данным требованиям, самостоятельно.

Из-за ожидаемых высоких концентраций фавипиравира в плазме крови человека при исследовании инфузионных лекарственных форм с высокими дозировками предпочтительным методом исследования был выбран ВЭЖХ-УФ.

В данном исследовании была приведена разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков плазмы крови метанолом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование было проведено на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-2040C (Shimadzu Corporation, Япония) с встроенным УФ-детектором, четырехкомпонентным градиентным насосом низкого давления, дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и контроллером. Обработка первичных данных проводилась в программном обеспечении LabSolutions (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (класс «Ultra Gradient HPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция; класс «Ultra Gradient HPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания), аммиак водный (класс «for analysis», PanReac, Испания), вода деминерализованная I класса. Для приготовления исходных стандартных растворов и рабочих стандартных растворов были использованы стандартные образцы фавипиравира (АО «Биохимик», Россия, количественное содержание 100,30 %) и ралтегравира калия (USP reference standard, США, количественное содержание 99,10 %).

Исходный стандартные раствор фавипиравира (ФАВ) [favipiravir (FAV)], и внутреннего стандарта (ВС) ралтегравира (РАЛ) [raltegravir (RAL)] готовили путем растворения точной навески субстанций в ацетонитриле. Рабочие стандартные растворы фавипиравира готовили путем разведения исходных растворов ацетонитрилом до заданных концентраций в плазме крови, соответствующих уровням 1–8, нижнему пределу количественного определения (НПКО) [lower limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], средним [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2).

[1] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/ Ссылка активна на 17.07.2022.

[2] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 17.07.2022.

Таблица 1. Методики количественного определения фавипиравира

Table 1. Methods of favipiravir quantitative determination

Аналитический метод (источник ионизации; ионизация (+/–), если применимо) Analytical method (ionization source; ionization (+/–) if applicable)	**Объект анализа** Object	**Пробоподготовка** Sample preparation	**Аналитический диапазон** Analytical range	**Ссылка** Reference
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	3,10–60,00 мкг/мл 3.10–60.00 μg/mL	[9]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	25,00–80,00 нг/мл 25.00–80.00 ng/mL	[10]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	0,20–3,20 мкг/мл 0.20–3.20 μg/mL	[11]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	0,10–100,00 мкг/мл 0.10–100.00 μg /mL	[12]
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков изопропанолом Protein precipitation by isopropanol	40,00–240,00 нг/мл 40.00–240.00 ng/mL	[13]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation by methanol	100,00–20000,00 нг/мл 100.00–20000.00 ng/mL	[14]
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) UPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	0,25–16,00 мкг/мл 0.25–16.00 μg/mL	[15]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	0,048–50,00 мкг/мл 0.048–50.00 μg/mL	[16]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; +) HPLC-MS/MS (electrospray; +)			0,062–50,00 мкг/мл 0.062–50.00 μg/mL	

Таблица 2. Концентрации фавипиравира и ралтегравира в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 2. Concentrations of favipiravir and raltegravir at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	**Концентрация аналита, мкг/мл** Analyte concentration, μg/mL	**Концентрация ВС, мкг/мл** IS concentration, μg/mL
	ФАВ FAV	**РАЛ** RAL
1	0,25	60,00
2	5,00	60,00
3	10,00	60,00
4	25,00	60,00
5	50,00	60,00
6	70,00	60,00
7	90,00	60,00
8	200,00	60,00
LLOQ	0,25	60,00
L	0,75	60,00
M1	40,00	60,00
M2	110,00	60,00
H	160,00	60,00

Образцы интактной плазмы крови человека, а также исходные стандартные растворы и рабочие стандартные растворы хранились в морозильной камере при температуре от –50 °С до –35 °С.

Пробоподготовка

К 200 мкл образца, помещенного в микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 30 мкл рабочего раствора ВС ралтегравира и проводили осаждение 600 мкл метанола. Далее перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд и центрифугировали с ускорением 15 000 g в течение 15 минут. Затем супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа для последующего анализа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение происходило на колонке Phenomenex Kinetex®, 150 × 4,6 мм, 5 мкм при скорости потока подвижной фазы (ПФ) 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл, температура термостата колонки поддерживалась на уровне 40 °С.

В качестве подвижной фазы использовались:

- *Элюент А*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08%-го аммиака (по объему).
- *Элюент В*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, 10%-й раствор воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08%-го аммиака (по объему).

Был использован градиентный режим элюирования, представленный в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %
0,00	96,0	4,0
1,00	96,0	4,0
2,80	85,0	15,0
5,00	0,0	100,0
7,00	0,0	100,0
7,50	96,0	4,0
9,00	96,0	4,0

Время удерживания фавипиравира составило около 3,8 минут, ралтегравира – около 5,5 минут. Общее время регистрации хроматограммы по УФ-детектору составило 9,0 минут.

Детектирование проводили при длине волны 323 ± 2 нм при частоте регистрации сигнала детектора 5 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Особенностью разработки методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ являлся широкий аналитический диапазон.

Длина волны детектирования в пределах 323 ± 2 нм была подобрана на основании данных о спектрах поглощения фавипиравира в УФ-области [17].

Исходя из физико-химических свойств фавипиравира была подобрана хроматографическая колонка Phenomenex Kinetex®, C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм. При использовании данной колонки удалось добиться наиболее полного разделения компонентов матрицы.

Ралтегравир был выбран в качестве ВС. Данное вещество схоже с анализируемым веществом по своей структуре и физико-химическим свойствам (таблица 4).

В качестве осадителя был выбран метанол, т. к. при его использовании удалось добиться наиболее полного осаждения белков плазмы крови и получить оптимальную форму хроматографических пиков.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза[1], а также руководств EMA[2] и FDA[3] по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность и прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения (НПКО), перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов; краткосрочная («настольная» и «постпрепаративная») и долгосрочная стабильность аналита в матрице; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке).

Селективность

Для оценки данного параметра проводили анализ шести образцов интактной плазмы крови, двух образцов гемолизной интактной плазмы и двух образцов интактной плазмы с повышенным содержанием липидов, а также образцов с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации фавипиравира 0,25 мкг/мл и рабочего раствора ВС ралтегравира до концентрации 60,00 мкг/мл, что соответствует уровню НПКО (см. таблица 2).

Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека представлена на рисунке 1. Сигналы пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания фавипиравира и ралтегравира, не превышают 20 % от сигнала фавипиравира на уровне НПКО и 5 % от сигнала ралтегравира соответственно.

Калибровочная кривая

Был проведен анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС ралтегравира до концентрации 60,00 мкг/мл и рабочих стандартных растворов фавипиравира до концентраций в диапазоне 0,25–200,00 мкг/мл, соответствующих уровням 1–8 (см. таблица 2). По полученным значениям концентраций были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика фавипиравира к площади пика ралтегравира от отношения концентрации фавипиравира к концентрации ралтегравира в плазме крови. Калибровочные графики имели линейный вид (рисунок 2). Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–3 приведены в таблице 5.

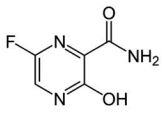
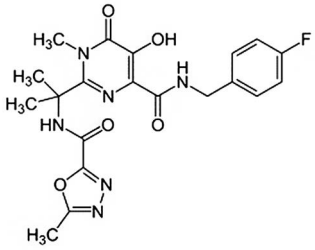
[1] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107/ Ссылка активна на 17.07.2022.

[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Accessed: 17.07.2022.

[3] Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Accessed: 17.07.2022.

Таблица 4. Физико-химические свойства анализируемого вещества и внутреннего стандарта

Table 4. Chemical and physical characteristics of the analyte and of the internal standard

Наименование субстанции Name of substance	**Фавипиравир**[1] Favipiravir[1]	**Ралтегравир**[2] Raltegravir[2]
Рациональное название (ИЮПАК) IUPAC name	6-фторо-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide	N-(2-(4-(4-Фторбензилкарбамоил)-5-гидрокси-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-2-ил)пропан-2-ил)-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоксамид N-(4-Fluorobenzyl)-5-hydroxy-1-methyl-2-(2-{[(5-methyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbonyl]amino}-2-propanyl)-6-oxo-1,6-dihydro-4-pyrimidinecarboxamide
pKa	9,39	7,02
logP	0,49	1,30
Структурная формула Chemical structure		

Примечание. [1] Favipiravir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB12466/ Ссылка активна на 17.07.2022.
[1] Raltegravir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB06817/ Ссылка активна на 17.07.2022.

Note. [1] Favipiravir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB12466/ Accessed: 17.07.2022.
[1] Raltegravir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB06817/ Accessed: 17.07.2022.

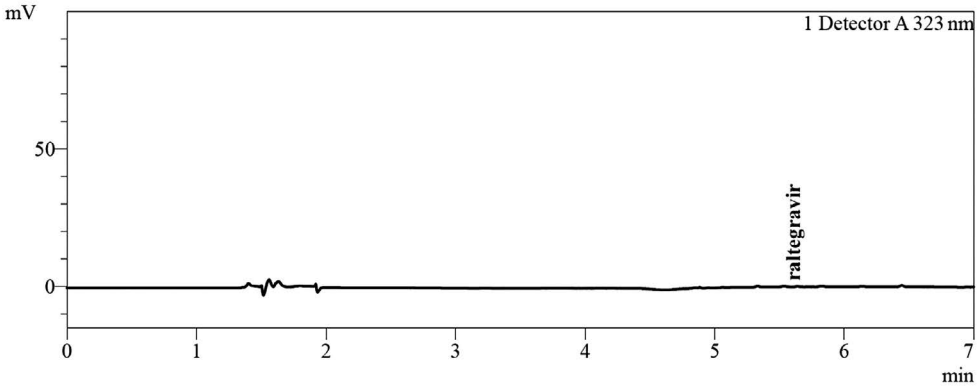


Рисунок 1. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 1. Chromatogram of blank human plasma sample

Полученные значения коэффициентов корреляции составляют более 0,999 и соответствуют нормам. Хроматограмма калибровочного образца на уровне 8 (таблица 2) представлена на рисунке 3.

Таблица 5. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

Table 5. Calibration equation and correlation coefficients

№	**Уравнение калибровочной кривой** Calibration equation	R
1	$y = 3{,}15469 \cdot x + 0{,}00327657$	0,9990149
2	$y = 3{,}21830 \cdot x + 0{,}00168604$	0,9992910
3	$y = 3{,}26573 \cdot x + 0{,}000615190$	0,9990230

Точность и прецизионность

Для оценки параметров «точность» и «прецизионность» были проанализированы калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2 и H, с номинальной концентрацией фавипиравира в образцах, равной 0,75 мкг/мл, 40,00 мкг/мл, 110,00 мкг/мл и 160,00 мкг/мл, соответственно, и концентрацией ВС ралтегравира 60,00 мкг/мл (см. таблица 2). Анализировали по пять образцов в рамках трех последовательностей (внутри цикла, между двумя и между тремя циклами). Относительное стандартное отклонение (RSD, %) и от-

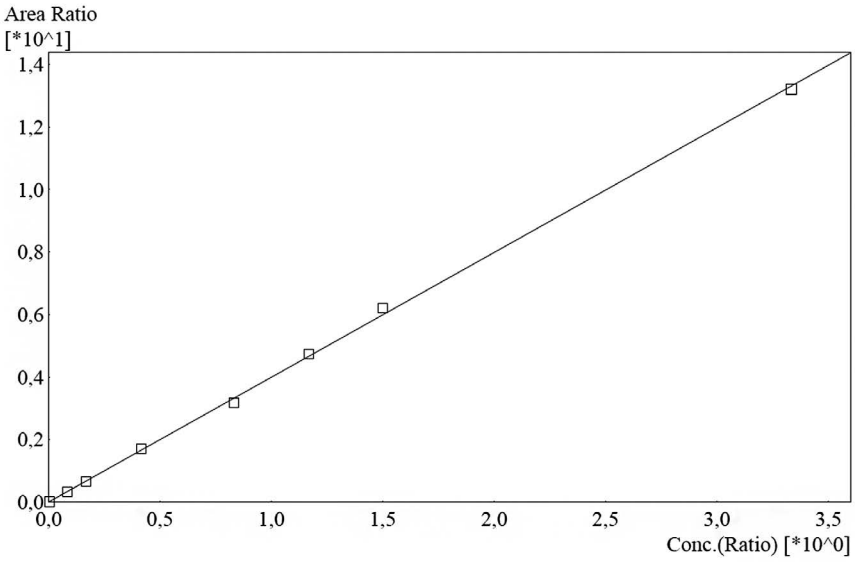


Рисунок 2. **Калибровочный график**

Figure 2. **Calibration curve**

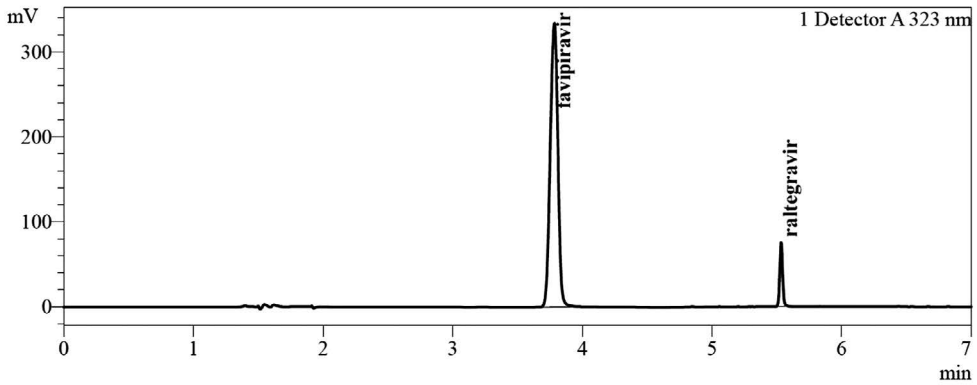


Рисунок 3. **Хроматограмма образца плазмы крови, уровень 8**

Figure 3. **Chromatogram of human blood sample with favipiravir at level 8**

носительная погрешность (E, %), рассчитанные для полученных значений концентраций, соответствуют нормам. Данные представлены в таблице 6.

Степень извлечения

Для оценки параметра «степень извлечения» были проанализированы по три образца, приготовленные из интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы и интактной плазмы с повышенным содержанием липидов без влияния степени извлечения на уровнях L, M1, M2 и H (таблица 2), а также образцы контроля качества, приготовленные на различных видах биологической интактной матрицы для оценки степени извлечения. Среднее значение степени извлечения фавипиравира из различных видов интактных матриц составляет 100,36 %. Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения фавипиравира из различных видов интактных матриц не превышает 15 % и соответствует критериям приемлемости. Данные представлены в таблице 7.

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения методики был определен на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. За НПКО методики была принята минимальная концентрация фавипиравира в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количест-

Таблица 6. Точность и прецизионность методики определения фавипиравира (внутри цикла, между двумя циклами, между тремя циклами)

Table 6. Accuracy and precision of favipiravir determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Введено (мкг/мл) Injected (μg/mL)	RSD, %			E, %		
	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)
0,25	6,09	6,20	6,03	0,97	–2,10	–0,42
0,75	1,24	1,74	5,70	–5,98	–6,16	–2,65
40,00	0,08	5,36	4,90	4,87	–0,20	–1,71
110,00	0,06	1,20	1,39	6,05	7,28	6,55
160,00	0,04	3,02	4,35	5,24	2,30	–0,13

венное определение фавипиравира со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20 %. НПКО фавипиравира в плазме крови человека составил 0,25 мкг/мл. Хроматограмма плазмы крови с содержанием фавипиравира на уровне НПКО представлена на рисунке 4.

Таблица 7. Оценка степени извлечения фавипиравира на уровнях L, M1, M2 и H из различных видов биологической матрицы

Table 7. Calculation of favipiravir recovery at levels L, M1, M2, H from the different biological matrix

Биологическая матрица Biological matrix	Степень извлечения ФАВ, % Recovery FAV, %			
	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	91,12	111,11	98,18	103,97
	93,91	111,14	98,25	103,96
	90,26	111,20	98,18	103,97
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	88,66	104,29	103,68	102,97
	88,74	103,99	103,54	102,94
	85,85	104,01	103,44	103,03
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	91,95	100,62	105,77	102,50
	89,80	100,70	105,42	102,51
	94,70	100,58	105,56	102,42
Среднее Average	100,36			
SD	6,58			
RSD	6,56			

Стабильность

Были проанализированы по три образца для оценки настольной и постпрепаративной краткосрочной стабильности, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, стабильности исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 112 дней при температуре –50 °С до –35 °С), долгосрочной стабильности (при хранении в течение 112 дней при температуре от –50 °С до –35 °С) аналита на уровнях L и H (таблица 2). Величины относительной погрешности, рассчитанные для полученных значений концентраций, соответствуют критериям приемлемости (таблица 8).

Перенос пробы

Для оценки параметра «перенос пробы» в рамках валидационных циклов № 1–3 был проведен последовательный анализ калибровочных образцов на уровне 8 (таблица 2) и образцов интактной плазмы крови. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови значения площадей фавипиравира и ралтегравира соответствовали критериям приемлемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена разработка и валидация методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтверж-

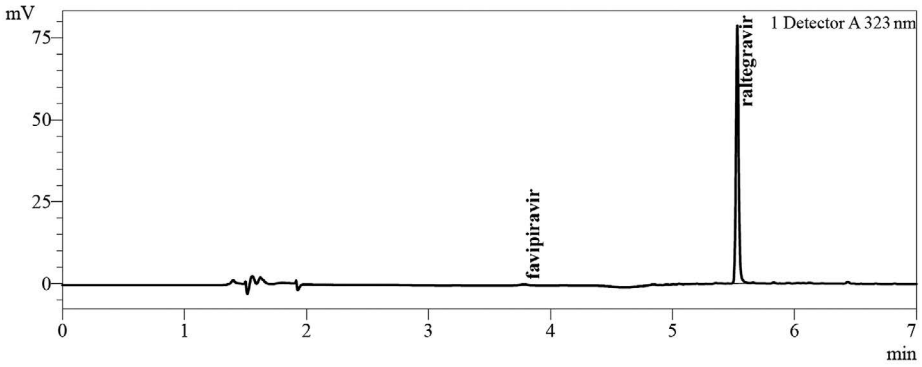


Рисунок 4. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень НПКО

Figure 4. LLOQ plasma sample chromatogram

Таблица 8. **Оценка стабильности**

Table 8. **Stability assessment**

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Среднее значение E, % Average value of E, %	
		L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	–6,12	6,31
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	48 часов при температуре 4 °C 48 hours at 4 °C	–4,31	–0,70
Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	36 часа при температуре –42,5 ± 7,5 °C и 6 часов при температуре 20 ± 5°C 36 hours at –42.5±7.5 °C and 6 hours at 20 ± 5 °C	–10,72	–13,31
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	112 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C	–4,88	3,13
Стабильность исходных стандартных растворов Stock solution stability	112 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C	–7,31	–10,67
Стабильность рабочих стандартных растворов Work solution stability	112 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C	–7,66	–10,58

денный аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл в плазме крови человека. Данный аналитический диапазон позволяют применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований препаратов фавипиравира.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yu Y., Lau M. M., Lau J. T. Application of the protection motivation theory to understand determinants of compliance with the measure of banning gathering size >4 in all public areas for controlling COVID-19 in a Hong Kong Chinese adult general population. *Plos one*. 2022;17(5):e0268336. DOI: 10.1371/journal.pone.0268336.
2. Заплатников А. Л., Бурцева Е. И., Гирина А. А., Свинцицкая В. И., Леписева И. В. Активная специфическая иммунопрофилактика гриппа в условиях пандемии COVID-19 и начало вакцинации против коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. *Педиатрия. Consilium Medicum*. 2020;4:12–16. DOI: 10.26442/26586630.2020.4.200580.
3. Chenchula S., Karunakaran P., Sharma S., Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *Journal of Medical Virology*. 2022;94(7):2969–2976. DOI: 10.1002/jmv.27697.
4. Tseng H. F., Ackerson B. K., Luo Y., Sy L. S., Talarico C. A., Tian Y., Bruxvoort K. J., Tubert J. E., Florea A., Ku J. H., Lee G. S. Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants. *Nature Medicine*. 2022;28(5):1063–1071. DOI: 10.1038/s41591-022-01818-y.
5. Zhao L., Zhong W. Mechanism of action of favipiravir against SARS-CoV-2: Mutagenesis or chain termination? *The Innovation*. 2021;2(4):100165. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100165.
6. Pavlova V., Hristova S., Uzunova K., Vekov T. A review on the mechanism of action of favipiravir and hydroxychloroquine in COVID-19. *Res. Rev. Insights*. 2021;5:1–7. DOI: 10.15761/RRI.1000167.
7. Cakir B. K., Firat O., Demirkan K. Administration of Potential Medications for COVID-19 Treatment Through Feeding Tube. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;18(3):250. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.52223.
8. Балыкова Л. А., Заславская К. Я., Павелкина В. Ф., Пятаев Н. А., Селезнева Н. М., Кириченко Н. В., Иванова А. Ю., Родоман Г. В., Колонтарев К. Б., Скрупский К. С., Симакина Е. Н. Эффективность и безопасность инфузионного введения фавипиравира у пациентов, госпитализированных с COVID-19. *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):113–126. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-113-126.
9. Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakareia Z., Abu Dayyih W. Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma. *Molecules*. 2021;26(13):3789. DOI: 10.3390/molecules26133789.
10. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Elshafeey A. H., Mansour F. R. Determination of favipiravir in human plasma using homogeneous liquid–liquid microextraction followed by HPLC/UV. *Bioanalysis*. 2021;14(4):205–216. DOI: 10.4155/bio-2021-0219.
11. Duse P. V., G Baheti K. G. Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Favipiravir in Spiked Human Plasma by using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(47A):275–281. DOI: 10.9734/JPRI/2021/v33i47A33014.
12. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for COVID-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
13. Megahed S., Habib A., Hammad S., Kamal A. Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*. 2021;3(2):70–78. DOI: 10.51435/turkjac.963652.
14. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A Novel LC-MS/MS Method for Determination of the Potential Antiviral Candidate Favipiravir for the Emergency Treatment of SARS-CoV-2 Virus in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study in Egyptian Human Volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
15. Rezk M. R., Badr K. A., Abdel-Naby N. S., Ayyad M. M. A Novel, Rapid and Simple UPLC–MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(7):e5098. DOI: 10.1002/bmc.5098.
16. Onmaz D. E., Abusoglu S., Onmaz M., Yerlikaya F. H., Unlu A. Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS/MS method for the quantitation of favipiravir in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2021;1176:122768. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122768.
17. Bulduk İ. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*. 2021;33(3):209–215. DOI: 10.1556/1326.2020.00828.

REFERENCES

1. Yu Y., Lau M. M., Lau J. T. Application of the protection motivation theory to understand determinants of compliance with the measure of banning gathering size >4 in all public areas for controlling COVID-19 in a Hong Kong Chinese adult general population. *Plos one*. 2022;17(5):e0268336. DOI: 10.1371/journal.pone.0268336.

2. Zaplatnikov A. L., Burceva E. I., Girina A. A., Svincickaja V. I., Lepiseva I. V. active specific immunoprophylaxis of influenza in the context of the covid-19 pandemic and the beginning of vaccination against coronavirus infection caused by the SARS-COV-2 virus. *Pediatrija. Consilium Medicum*. 2020;4:12–16. (In Russ.) DOI: 10.26442/26586630.2020.4.200580.
3. Chenchula S., Karunakaran P., Sharma S., Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *Journal of Medical Virology*. 2022;94(7):2969–2976. DOI: 10.1002/jmv.27697.
4. Tseng H. F., Ackerson B. K., Luo Y., Sy L. S., Talarico C. A., Tian Y., Bruxvoort K. J., Tubert J. E., Florea A., Ku J. H., Lee G. S. Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants. *Nature Medicine*. 2022;28(5):1063–1071. DOI: 10.1038/s41591-022-01818-y.
5. Zhao L., Zhong W. Mechanism of action of favipiravir against SARS-CoV-2: Mutagenesis or chain termination? *The Innovation*. 2021;2(4):100165. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100165.
6. Pavlova V., Hristova S., Uzunova K., Vekov T. A review on the mechanism of action of favipiravir and hydroxychloroquine in COVID-19. *Res. Rev. Insights*. 2021;5:1–7. DOI: 10.15761/RRI.1000167.
7. Cakir B. K., Firat O., Demirkan K. Administration of Potential Medications for COVID-19 Treatment Through Feeding Tube. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;18(3):250. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.52223.
8. Balykova L. A., Zaslavskaja K. Ja., Pavelkina V. F., Pjataev N. A., Selezneva N. M., Kirichenko N. V., Ivanova A. Ju., Rodoman G. V., Kolontarev K. B., Skrupskij K. S., Simakina E. N. effectiveness and safety of favipiravir infusion in patients hospitalized with COVID-19. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1):113–126. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-113-126.
9. Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakareia Z., Abu Dayyih W. Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma. *Molecules*. 2021;26(13):3789. DOI: 10.3390/molecules26133789.
10. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Elshafeey A. H., Mansour F. R. Determination of favipiravir in human plasma using homogeneous liquid–liquid microextraction followed by HPLC/UV. *Bioanalysis*. 2021;14(4):205–216. DOI: 10.4155/bio-2021-0219.
11. Duse P. V., G Baheti K. G. Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Favipiravir in Spiked Human Plasma by using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(47A):275–281. DOI: 10.9734/JPRI/2021/v33i47A33014.
12. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for COVID-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
13. Megahed S., Habib A., Hammad S., Kamal A. Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*. 2021;3(2):70–78. DOI: 10.51435/turkjac.963652.
14. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A Novel LC-MS/MS Method for Determination of the Potential Antiviral Candidate Favipiravir for the Emergency Treatment of SARS-CoV-2 Virus in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study in Egyptian Human Volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
15. Rezk M. R., Badr K. A., Abdel-Naby N. S., Ayyad M. M. A Novel, Rapid and Simple UPLC–MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(7):e5098. DOI: 10.1002/bmc.5098.
16. Onmaz D. E., Abusoglu S., Onmaz M., Yerlikaya F. H., Unlu A. Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS/MS method for the quantitation of favipiravir in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2021;1176:122768. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122768.
17. Bulduk İ. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*. 2021;33(3):209–215. DOI: 10.1556/1326.2020.00828.

pharmtech & ingredients



24-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства

22–25 ноября 2022

Москва,
Крокус Экспо

Получите бесплатный билет на сайте по промо-коду: pha22print

pharmtech-expo.ru

+7 (495) 799-55-85
pharmtech@ite.group

ITE ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER

0+

Реклама

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-231-237
UDC 614.8.084:614.273:615.281:332.14

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Issues of National Drug Security in Formation of a Reserve of Antibacterial Agents Intended to Eliminate Medical and Sanitary Consequences of Emergencies

Larisa Yu. Chernikova[1]✉, Vadim N. Dmitruk[3], Nikolay L. Denisov[1,2], Elvira G. Morozova[1], Alexander V. Ratkin[1], Elena V. Karakulova[1]

[1] Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia
[2] Territorial Center of Disaster Medicine of the Tomsk Region, 54, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russia
[3] Samara State Medical University, 89, Chapayevskaya str., Samara, 443099, Russia

✉ **Corresponding author:** Larisa Yu. Chernikova. **E-mail:** lachernik@yandex.ru

ORCID: Larisa Yu Chernikova – https://orcid.org/0000-0001-9001-0971; Vadim N. Dmitruk – https://orcid.org/0000-0003-1130-0773; Nikolay L. Denisov – https://orcid.org/0000-0003-2543-7113; Elvira G. Morozova – https://orcid.org/0000-0002-7372-6801; Alexander V. Ratkin – https://orcid.org/0000-0003-1438-5119; Elena V. Karakulova – https://orcid.org/0000-0002-5145-2176.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 16.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. The article considers the issues of forming a reserve of antibacterial agents designed to eliminate medical and sanitary consequences of emergencies from the perspective of national drug security.

Aim. To determine the degree of import substitution of antibacterial agents included in the regional drug reserve.

Materials and methods. We carried out a content analysis of data from regulatory documents and research papers related to formation of drug reserves, a logical and structural analysis of the range of antibacterial agents included in the reserve of the Tomsk region, and an analysis of data from the National Drug Register. In the study, we used the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System of drugs.

Results and discussion. It was established that for 19 international nonproprietary names (INN) of antibacterial agents belonging to the group of antibacterials for systemic use (ATC code J01) and forming the reserve of the Tomsk region, 294 brand names (BN) were registered on the pharmaceutical market of the Russian Federation in 2021. The share of registered domestic BN was 49.3 %, and the degree of import dependence of domestic drug manufacturing on foreign-made active pharmaceutical ingredients (APIs) was 81.4 %. It was found that 6 Russian enterprises manufacture APIs that supply production of 10 antibacterial agents included in the drug reserve. A classification of medicines by strategic availability for replenishing the drug reserve was developed. A map on strategic availability of domestically manufactured antibacterial agents included in the reserve was drawn up.

Conclusion. We demonstrated high dependence of antibacterial reserve formation on import of this group of medicines and APIs to the Russian Federation. The classification of medicines which takes into account the possibility of replenishing the drug reserve in emergency conditions and if import of medicines stops can be recommended for use by the center for disaster medicine to optimize the nomenclature of drug reserves at various levels from the perspective of national drug security promotion.

Keywords: drug supply in emergencies, import substitution of drugs and active pharmaceutical ingredients, national drug security, reserve of medical supplies

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. Larisa Yu. Chernikova, Elena V. Karakulova were engaged in drawing up the design of the study. Larisa Yu. Chernikova, Nikolay L. Denisov, Elvira G. Morozova conducted research, analysis of the obtained data. Vadim N. Dmitruk, Larisa Yu. Chernikova, Elena V. Karakulova participated in writing the text of the article. All the authors contributed to the discussion of the article.

For citation: Chernikova L. Yu., Dmitruk V. N., Denisov N. L., Morozova E. G., Ratkin A. V., Karakulova E. V. Issues of national drug security in formation of a reserve of antibacterial agents intended to eliminate medical and sanitary consequences of emergencies. *Drug development & registration*. 2022;11(3):231–237. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-231-237

Вопросы национальной лекарственной безопасности при формировании резерва антибактериальных средств, предназначенного для ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций

Л. Ю. Черникова[1]✉, В. Н. Дмитрук[3], Н. Л. Денисов[1,2], Э. Г. Морозова[1], А. В. Ратькин[1], Е. В. Каракулова[1]

[1] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
[2] ОГБУЗ «Территориальный центр медицины катастроф», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 54
[3] ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» (СамГМУ), 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89

✉ **Контактное лицо:** Черникова Лариса Юрьевна. **E-mail:** lachernik@yandex.ru

© Chernikova L. Yu., Dmitruk V. N., Denisov N. L., Morozova E. G., Ratkin A. V., Karakulova E. V., 2022
© Черникова Л. Ю., Дмитрук В. Н., Денисов Н. Л., Морозова Э. Г., Ратькин А. В., Каракулова Е. В., 2022

ORCID: Л. Ю. Черникова – https://orcid.org/0000-0001-9001-0971; В. Н. Дмитрук – https://orcid.org/0000-0003-1130-0773; Н. Л. Денисов – https://orcid.org/0000-0003-2543-7113; Э. Г. Морозова – https://orcid.org/0000-0002-7372-6801; А. В. Ратькин – https://orcid.org/0000-0003-1438-5119; Е. В. Каракулова – https://orcid.org/0000-0002-5145-2176.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 16.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. В статье рассмотрены вопросы формирования резерва антибактериальных средств, предназначенного для ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций, с позиции национальной лекарственной безопасности.

Цель. Определить уровень импортозамещения антибактериальных средств, входящих в резерв регионального уровня.

Материалы и методы. Проведен контент-анализ данных нормативных документов и научных работ, связанных с формированием резервов лекарственных средств, логический и структурный анализ номенклатуры антибактериальных средств, входящих в резерв Томской области, анализ данных Государственного реестра лекарственных средств. В исследовании использовали анатомо-терапевтическо-химическую (АТХ) систему классификации лекарственных средств.

Результаты и обсуждение. Установлено, что для 19 международных непатентованных наименований (МНН) антибактериальных средств, относящихся к группе антибактериальных средств для системного применения (код АТХ J01) и образующих резерв Томской области, на фармацевтическом рынке РФ в 2021 году зарегистрировано 294 торговых наименования (ТН). Доля зарегистрированных отечественных ТН составила 49,3 %, а уровень импортозависимости производства отечественных препаратов от иностранных активных фармацевтических субстанций (АФС) – 81,4 %. Установлено, что 6 российских предприятий выпускают АФС, обеспечивающие производство 10 антибактериальных средств, включенных в резерв. Разработана классификация лекарственных средств по стратегической доступности для пополнения резерва лекарственных средств. Составлена карта стратегической доступности производства антибактериальных средств резерва на территории РФ.

Заключение. Показана высокая зависимость формирования резерва антибактериальных средств от импорта в Российскую Федерацию данной группы препаратов и АФС. Классификация лекарственных средств, учитывающая возможность пополнения резервов в условиях чрезвычайных ситуаций и при прекращении импорта лекарственных средств, может быть рекомендована для использования службой медицины катастроф для оптимизации номенклатуры резервов различного уровня с позиции обеспечения национальной лекарственной безопасности.

Ключевые слова: лекарственное обеспечение в чрезвычайных ситуациях, импортозамещение лекарственных препаратов и активных фармацевтических субстанций, национальная лекарственная безопасность, резервы медицинского имущества

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

Вклад авторов. Л. Ю. Черникова и Е. В. Каракулова занимались составлением дизайна исследования. Л. Ю. Черникова, Н. Л. Денисов и Э. Г. Морозова проводили исследования и анализ полученных данных. В. Н. Дмитрук, Л. Ю. Черникова и Е. В. Каракулова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Черникова Л. Ю., Дмитрук В. Н., Денисов Н. Л., Морозова Э. Г., Ратькин А. В., Каракулова Е. В. Вопросы национальной лекарственной безопасности при формировании резерва антибактериальных средств, предназначенного для ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):231–237. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-231-237

INTRODUCTION

A reserve of medical supplies intended to eliminate medical and sanitary consequences of natural and man-made disasters (further referred to as "Reserve") is an indispensable component of state guarantees for medical care provision for the population affected in emergencies. Currently, a potential risk of emergencies in the Russian Federation against the background of unstable epidemiological situation in the world requires maintaining drug reserves in constant readiness at all levels of the Unified State System for the Prevention and Elimination of Emergencies (RSE). Medicines from the reserves of RSE territorial subsystems are in most demand [1–6].

Availability and efficiency of the drug reserve in the Tomsk region determine promptness of emergency delivery of medicines included in the reserve when the state of emergency is declared. For guaranteed and uninterrupted drug supply in emergencies, the reserve should be formed from domestically produced medicines[1] [7–9], since independence of production of life-saving and essential medicines of imported APIs, as well as availability of medicines in the required volume and range characterize national drug security [10–12]. Otherwise, the formation of the reserve is impossible, since the access of foreign-made APIs to the pharmaceutical market of the Russian Federation for some reason or another can be terminated at any time [13–16].

The ABC analysis of the range of medicines in the reserve of the Tomsk region, intended to provide care and treatment for 500 victims, showed that antibacterial

[1] Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 66 (13.02.2013) "On approving the strategy for drug supply of the population of the Russian Federation for the period up to 2025 and the plan for its implementation". Available at: https://www.garant.ru. Accessed: 10.11.2020. (In Russ.)

agents (ABA) constitute one of the main groups of medicines[1], which determined the choice of this group as a model for the study.

The aim of present study was to determine the degree of import substitution of ABA included in the reserve of the Tomsk region.

MATERIALS AND METHODS

In the study, we carried out a content analysis of data from scientific publications and regulatory documents [1] and a logical and structural analysis of the range of ABA reserve of the Tomsk region[2,3]. To classify ABA included in the reserve, we used the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification System of drugs. For processing the data array, we used the MS Excel 2010 software.

RESULTS AND DISCUSSION

At the first stage of the study, an analysis of the degree of import substitution of ABA included in the reserve of the Tomsk region was carried out. For this, the range of ABA included in the reserve, formed according to the order of the Healthcare Department of the Tomsk Region No. 150 of 05.03.2018[4], was compared with data of the National Drug Register (NDR) as of 30.03.2021[5]. The analysis showed (table 1) that according to the NDR data, at the time of the study, 294 brand names (BN) were registered in the Russian Federation, which can form the nomenclature of 19 international nonproprietary names (INN) of ABA included in 8 subgroups of antibacterials for systemic use (ATC code J01) and forming the reserve of the Tomsk region.

The share of brand names of domestically produced ABA was 49.3 % (145 BN), which indicates relatively high dependence of ABA reserve formation on import of this group of medicines to the Russian Federation. Quinolone antibacterials (ATC code J01M) had the largest number of BN, their share in the total number of BN was 31.0 % (91 BN). Analysis of the imported medicines / domestically produced medicines ratio in this group exhibited the prevalence of BN of foreign-made ABA, their share was 59.3 % (54 BN), which is associated with a wide range of imported medicines with the INN "Levofloxacin" (27 BN). The second largest group in the range of BN is presented by other beta-lactam antibacterials (ATC code J01D) with a share of 30.3 % (89 BN) and a degree of import substitution of 49.4 % (44 BN). In this group, only one foreign-made medicine is registered for the INN "Ceftaroline fosamil". This may threaten promptness of medical care provision in emergencies, since import of this medicine to the pharmaceutical market of the Russian Federation may be terminated.

In other ABA groups, approximately equal shares of medicines produced by domestic and foreign manufacturers were identified.

Therefore, in 2021, the degree of import substitution of ABA included in the reserve of the Tomsk region was 49.3 %, which is significantly lower than 90 % specified in the corresponding decree of the President of the Russian Federation[6]. The state of affairs is exacerbated by the fact that for manufacturing many domestically produced ABA, imported APIs are used. It is proved by the findings of the analysis on supply of Russian manufacturers of ABA included in the reserve with domestically produced APIs (table 2).

The obtained findings demonstrate that the majority of ABA produced in the Russian Federation is manufactured from foreign-made APIs; the degree of import dependence in this parameter is 81.4 %. It is worth noting that tetracyclines (ATC code J01A), sulfonamides and trimethoprim (ATC code J01E), and aminoglycoside antibacterials (ATC code J01G), having the largest number of registered BN of domestically produced ABA, are 100 % dependent on APIs manufactured abroad. Additionally, the degree of import dependence is high in the groups of other antibacterials (ATC code J01X) (94.4 %), other beta-lactam antibacterials (ATC code J01D) (81.8 %), quinolone antibacterials (ATC code J01M) (81.1 %), and beta-lactam antibacterials, penicillins (ATC code J01C) (81.2 %).

The analysis of data on registration of APIs used for domestic production of ABA showed that the largest importers were China and India; their combined share was 50 % (figure 1).

[1] Chernikova L. Yu. ABC analysis of medicines intended for elimination of regional emergencies. Materials of the international scientific-practical conference of Avicenna TSMU Abuali ibn Sino (68th year) "Achievements and problems of fundamental science and clinical medicine", dedicated to the "Years of rural development, tourism and folk crafts (2019-2021)". Dushanbe. 2020. Available at: https://tajmedun.tj/ru/nauka-i-innovatsiya/konferentsii/godichnaya/. Accessed: 30.03.2021. (In Russ.)

[2] On approving the range and volume of medicines and medical supplies included in the reserves of material resources of the Tomsk region for prevention and elimination of intermunicipal and regional emergencies". Available at: https://www.tcmk-tomsk.ru/pages/normativnyie-dokumentyi/. Accessed: 01.10.2020. (In Russ.).

[3] Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 598 (26.08.2013) "On approving the regulations on the reserves of medical resources of the Ministry of Health of the Russian Federation for elimination of medical and sanitary consequences of emergencies, its nomenclature and volume". Available at: http://base.garant.ru/71700934/. Accessed: 01.10.2020. (In Russ.)

[4] On approving the range and volume of medicines and medical supplies included in the reserves of material resources of the Tomsk region for prevention and elimination of intermunicipal and regional emergencies". Available at: https://www.tcmk-tomsk.ru/pages/normativnyie-dokumentyi/. Accessed: 01.10.2020. (In Russ.).

[5] National Drug Register of the Russian Federation. Available at: http://www.grls.rosminzdrav.ru. Accessed: 30.03.2021. (In Russ.)

[6] Decree of the President of the Russian Federation No. 598 (07.05.2012) «On improving the state policy in the field of healthcare". Available at: http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201205070022. Accessed: 30.03.2021. (In Russ.)

Table 1. Characteristics of the range of antibacterials in the reserve of the Tomsk region in terms of production

ATC code	Group	INN	Registered by BN					
			Total		Domestically produced		Foreign-made	
			abs.	%	abs.	%	abs.	%
J01A	Tetracyclines	Doxycycline	7.0	2.4	5.0	71.4	2.0	28.6
J01C	Beta-lactam antibacterials, penicillins	Ampicillin	5.0	1.7	4.0	80.0	1.0	20.0
		Phenoxymethylpenicillin	1.0	0.3	1.0	100.0	0	0
		Oxacillin	1.0	0.3	1.0	100.0	0	0
		Amoxicillin + clavulanic acid	22.0	7.5	10.0	45.5	12.0	54.5
		TOTAL	29.0	9.9	16.0	55.2	11.0	44.8
J01D	Other beta-lactam antibacterials	Cefazolin	10.0	3.4	7.0	70.0	3.0	30.0
		Cefatoxime	20.0	6.8	12.0	60.0	8.0	40.0
		Ceftriaxone	34.0	11.6	11.0	32.4	23.0	67.6
		Imipenem + [cilastatin]	3.0	1.0	2.0	66.7	1.0	33.3
		Meropenem	21.0	7.1	12.0	57.1	9.0	42.9
		Ceftaroline fosamil	1.0	0.3	0	0	1.0	100.0
		TOTAL	89.0	30.3	44.0	49.4	45.0	50.6
J01E	Sulfonamides and trimethoprim	Co-trimoxazole (sulfamethoxazole and trimethoprim)	6.0	2.0	3.0	50.0	3.0	50.0
J01F	Macrolides, lincosamides, and streptogramins	Azithromycin	38.0	12.9	20.0	52.6	18.0	47.4
J 01G	Aminoglycoside antibacterials	Gentamicin	4.0	1.4	2.0	50.0	2.0	50.0
J01M	Quinolone antibacterials	Ofloxacin	21.0	7.1	11.0	52.4	10.0	47.6
		Ciprofloxacin	28.0	9.5	11.0	39.3	17.0	60.76
		Levofloxacin	42.0	14.3	15.0	35.7	27.0	64.3
		TOTAL	91.0	31.0	37.0	40.7	54.0	59.3
J01X	Other antibacterials	Metronidazole	27.0	9.2	16.0	59.3	11.0	40.7
		Nitroxoline	3.0	1.0	2.0	66.7	1.0	33.3
		TOTAL	30.0	10.2	18.0	60.0	12.0	40.0
TOTAL			294.0	100.0	145.0	49.3	149.0	50.7

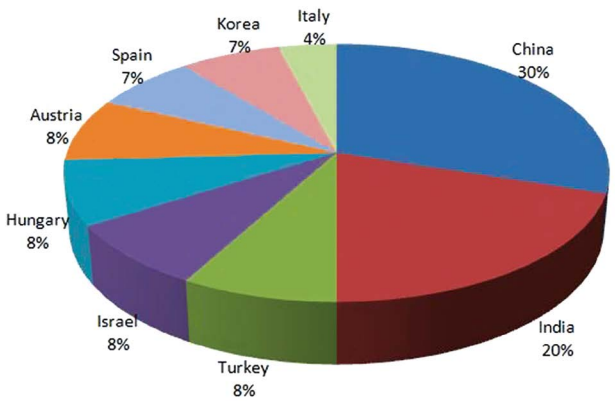


Figure 1. The structure of registered foreign-made APIs for manufacturing of domestically produced antibacterials

Therefore, real import substitution of ABA included in the reserve of the Tomsk region accounts for only 18.6 %. The analysis of data on distribution of manufacturing of domestically produced APIs demonstrated that Russian-made APIs that can be used for manufacturing ABA included in the reserve are produced by 6 companies (table 3).

The conducted analysis showed that the largest manufacturer of APIs in the Russian Federation is Sintez JSC, it produces 8 APIs from 3 ATC subgroups of antibacterials for systemic use (code J01). Two manufacturers – Irbit Chemical and Pharmaceutical Plant JSC and Active Component CJSC – synthesize one API not included in the range of substances produced by Sintez JSC. Other Russian manufacturers duplicate the range of APIs produced by Sintez JSC.

Therefore, 9 out of 19 INN of antibacterials included in the reserve are not supplied with domestically produced APIs: Doxycycline, Amoxicillin + clavulanic acid, Imipenem + [cilastatin], Ceftaroline fosamil, Co-trimoxazole (sulfamethoxazole and trimethoprim), Gentamicin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, and Metronidazole.

Following the conducted analysis of the range of ABA included in the reserve of the Tomsk region from the perspective of national drug security, we elaborated a classification of INN of ABA included in the reserve based on the strategic availability of medicines for replenishing the reserve under conditions of emergency and if import of medicines stops. We identified the following groups of medicines:

Table 2. Characteristics of the range of domestically produced antibacterials included in the reserve of the Tomsk region in terms of API origin

ATC code	Group	INN	Registered by BN					
			Total		Domestically produced APIs		Foreign-made APIs	
			abs.	%	abs.	%	abs.	%
J01A	Tetracyclines	Doxycycline	5.0	3.4	0	0	5.0	100.0
J01C	Beta-lactam antibacterials, penicillins	Ampicillin	4.0	2.8	2.0	50.0	2.0	50.0
		Phenoxymethylpenicillin	1.0	0.7	0	0	1.0	100.0
		Oxacillin	1.0	0.7	1.0	100.0	0	0
		Amoxicillin + clavulanic acid	10.0	6.9	0	0	10.0	100.0
		TOTAL	16.0	11.1	3.0	18.8	13.0	81.2
J01D	Other beta-lactam antibacterials	Cefazolin	7.0	4.8	2.0	28.6	5.0	71.4
		Cefatoxime	12.0	8.3	2.0	16.7	10.0	83.3
		Ceftriaxone	11.0	7.6	1.0	9.1	10.0	90.9
		Imipenem + [cilastatin]	2.0	1.4	0	0	2.0	100.0
		Meropenem	12.0	8.3	3.0	25.0	9.0	75.0
		Ceftaroline fosamil	–	–	–	–	–	–
		TOTAL	44.0	30.3	8.0	18.2	36.0	81.8
J01E	Sulfonamides and trimethoprim	Co-trimoxazole (sulfamethoxazole and trimethoprim)	3.0	2.1	0	0	3.0	100.0
J01F	Macrolides, lincosamides, and streptogramins	Azithromycin	20.0	13.8	8.0	40.0	12.0	60.0
J 01G	Aminoglycoside antibacterials	Gentamicin	2.0	1.4	0	0	2.0	100.0
J01M	Quinolone antibacterials	Ofloxacin	11.0	7.6	0	0	11.0	100.0
		Ciprofloxacin	11.0	7.6	0	0	11.0	100.0
		Levofloxacin	15.0	10.3	7.0	46.7	8.0	53.3
		TOTAL	37.0	25.5	7.0	18.9	30.0	81.1
J01X	Other antibacterials	Metronidazole	16.0	11.0	0	0	16.0	100.0
		Nitroxoline	2.0	1.4	1.0	50.0	1.0	50.0
		TOTAL	18.0	12.4	1.0	5.6	17.0	94.4
TOTAL			145.0	100.0	27.0	18.6	118.0	81.4

Group I "High availability" (domestically produced medicines and domestically produced APIs) encompasses 10 INN: Ampicillin, Phenoxymethylpenicillin, Oxacillin, Cefazolin, Cefatoxime, Ceftriaxone, Meropenem, Azithromycin, Levofloxacin, and Nitroxoline.

Group II "Medium availability" (domestically produced medicines and foreign-made APIs) includes 8 INN: Doxycycline, Amoxicillin + clavulanic acid, Imipenem + [cilastatin], Co-trimoxazole (sulfamethoxazole and trimethoprim), Gentamicin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, and Metronidazole.

Group III "Low availability" (foreign-made medicines and APIs) includes 1 INN – Ceftaroline fosamil.

To assess the possibility of sustainable functioning of the reserve of the Tomsk region, we drew up a map of strategic availability of domestically manufactured ABA in the Russian Federation (figure 2).

According to the map, production of ABA classified as groups I and II by strategic availability is concentrated in Siberian and Ural Federal Districts. This fact may be taken into account when planning the inclusion of ABA in the reserve of the Tomsk region, since close proximity of pharmaceutical manufacturers reduces shipping time, which is essential for replenishing the reserves.

CONCLUSION

Following the conducted study, we identified that for 19 INN of antibacterials included in 8 groups of antibacterials for systemic use (ATC code J01), 294 brand names were registered in the Russian pharmaceutical market in 2021. The share of domestically produced medicines was 49.3 % (145 BN). The degree of import substitution of ABA included in the reserve of the Tomsk region, with account of the sources of API production, was 18.6 %. Only 6 Russian manufacturers supply the production of ABA included in the reserve with APIs.

The classification of medicines by strategic availability developed using the reserve of the Tomsk region as an example can be recommended for use by the center for disaster medicine to optimize the range of medicines included in reserves at different levels from the perspective of national drug security promotion.

Table 3. **Russian manufacturers of APIs for antibacterials included in the reserve of the Tomsk region.**

ATC code	Group	INN	Manufacturers					
			Sintez JSC	DEKO Company LLC	Kraspharma SC	Irbit Chemical and Pharmaceutical Plant JSC	Active Component CJSC	Organica JSC
J01A	Tetracyclines	Doxycycline	–	–	–	–	–	–
J01C	Beta-lactam antibacterials, penicillins	Ampicillin	+	–	–	–	–	–
		Phenoxymethylpenicillin	+	–	–	–	–	–
		Oxacillin	+	–	+	–	–	+
		Amoxicillin + clavulanic acid	–	–	–	–	–	–
J01D	Other beta-lactam antibacterials	Cefazolin	+	+	–	–	–	–
		Cefatoxime	+	+	–	–	–	–
		Ceftriaxone	+	+	–	–	–	–
		Imipenem + [cilastatin]	–	–	–	–	–	–
		Meropenem	+	+	–	–	–	–
		Ceftaroline fosamil	–	–	–	–	–	–
J01E	Sulfonamides and trimethoprim	Co-trimoxazole (sulfamethoxazole and trimethoprim)	–	–	–	–	–	–
J01F	Macrolides, lincosamides, and streptogramins	Azithromycin	–	–	–	–	+	–
J 01G	Aminoglycoside antibacterials	Gentamicin	–	–	–	–	–	–
J01M	Quinolone antibacterials	Ofloxacin	–	–	–	–	–	–
		Ciprofloxacin	–	–	–	–	–	–
		Levofloxacin	+	–	–	–	+	–
J01X	Other antibacterials	Metronidazole	–	–	–	–	–	–
		Nitroxoline	–	–	–	+	–	–
TOTAL			8	4	1	1	2	1

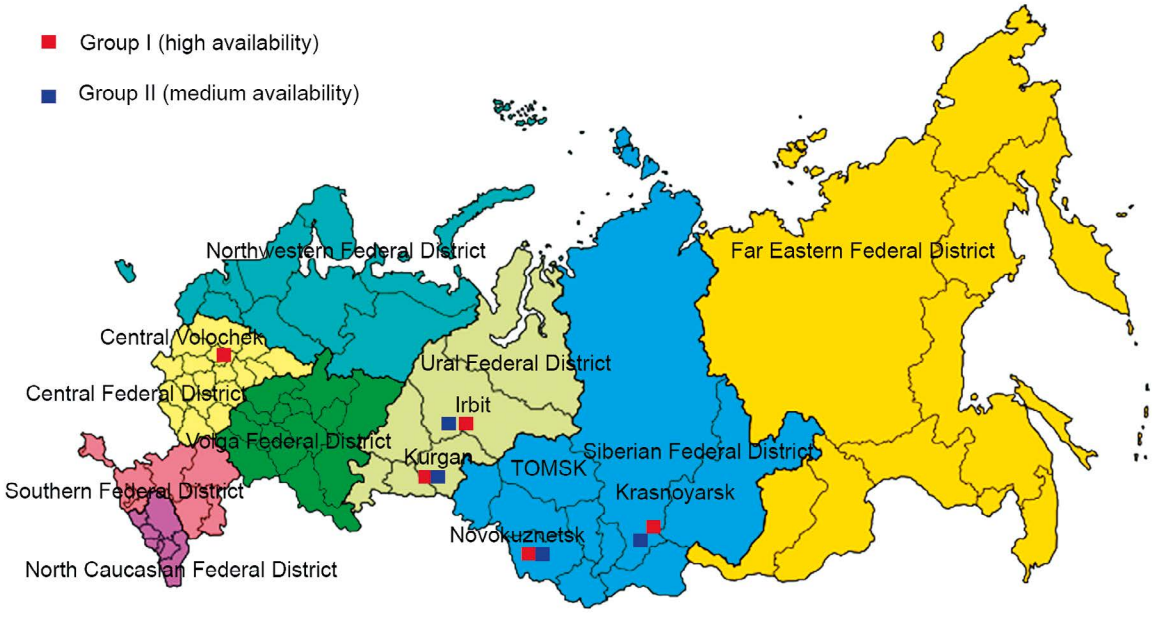


Figure 2. **A map of strategic availability of domestically produced antibacterials included in the reserve of the Tomsk region**

REFERENCES

1. Chizh I. M., Goryachev A. B., Lemeshchenko E. Y., Afanasev O. N., Kabakova T. I. Modern system of reserves and medical supplies for use in emergency situations. *Voenno-meditsinskiy zhurnal.* 2017;338(8):60–66. (In Russ.) DOI: 10.17816/RMMJ73456.
2. Belova A. B., Osadchiy K. N., Chubayko V. G., Yuvakaev I. S., Bobiy B. V., Sakhno I. I., Chernyak S. I. Current State and Development Prospects of Regional Disaster Medicine Service According to the 2016–2017 Audit Results. *Meditsina Katastrof*. 2018;103(3):5–8. (In Russ.) DOI: 10.33266/2070-1004-2018-3-5-8.
3. Goncharov S. F., Bobiy B. V., Akin'shin A. V. Service for Disaster Medicine of Ministry of Health of Russian Federation: Main Results of Activities in 2019 and Tasks for 2020. *Meditsina Katastrof.* 2020;1:15–27. (In Russ.) DOI: 10.33266/2070-1004-2020-1-15-27.
4. Goncharov S. F., Titov I. G., Bobiy B. V., Akin'shin A. V. Main results of activities of All-Russian Centre for Disaster Medicine "Zashchita" of Federal Medical Biological Agency in 2020 and tasks for 2021. *Meditsina Katastrof*. 2021;1:10–17. (In Russ.) DOI: 10.33266/2070-1004-2021-1-10-17.
5. Baranova N. N., Goncharov S. F. Current State of the Problem of Organizing and Conducting Medical Evacuation of Victims in Emergencies. *Meditsina Katastrof.* 2020;4:57–65. (In Russ.) DOI: 10.33266/2070-1004-2020-4-57-65.
6. Bystrov M. V. Analysis of Organizational Models of Disaster Medicine Service of the Ministry of Health of the Russian Federation at Regional Level. *Meditsina katastrof.* 2021;4:5–10. (In Russ.) DOI: 10.33266/2070-1004-2021-4-5-10.
7. Grigorieva K. D. Drug Import Replacement Is a Perspective Direction of the Development of Russian Economy. *Upravlencheskoe konsul'tirovanie.* 2018;(5):137–142. (In Russ.) DOI: 10.22394/1726-1139-2018-5-137-142.
8. Rodionov E. O., Evseev M. A. Features of provision of medicines of the population at humanitarian assistance to victims in emergency situations. *Sovremennaya organizatsiya lekarstvennogo obespecheniya.* 2019;6(2):20–21. (In Russ.). DOI: 10.30809/solo.2.2019.6.
9. Toluzakov A. K. Current trends and threats in drug supply for the population of the Russian Federation. *Kant*. 2021;39(2):106–110. (In Russ.) DOI: 10.24923/2222-243X.2021-39.20.
10. Oborin M. S. Problems and prospects of import substitution in the pharmaceutical industry of the region. *Nauchnyy vestnik: Finansy, Banki, Investitsii*. 2020;52(3):185–194. (In Russ.) DOI: 10.24412/2227-9407-2021-5-101-110.
11. Gilissen E., Mulligan C., Tottman S., Troein P. Agile stockpiles an insurance for drug supply. *Remedium.* 2020;(11-12):4–17. (In Russ.) DOI: 10.21518/1561-5936-2020-11-12-4-17.
12. Novikova E. V., Evseev A. V., Popov Y. S., Dovletli K. O. Development of the pharmaceutical and medical industry in the Russian Federation after EU and USA sanctions. *Vestnik Smolenskoy Gosudarstvennoy Medicinskoy Akademii*. 2019;18(2):209–215. (In Russ.)
13. Subhonberdiev A. S., Shevchenko A. N. Import substitution strategies in the global economy: lessons for Russia. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernyx texnologij*. 2018;80(4):398–402. (In Russ.) DOI: 10.20914/2310-1202-2018-4-398-402.
14. Tereshenko A. P. Ensuring drug independence as a factor in the economic and national security of the state. *Gumanitarnye, sotsial'no-ekonomicheskie i obshchestvennye nauki*. 2020;1(12):162–165. (In Russ.) DOI: 10.23672/c1758-0305-6989-g.
15. Grishina I. V. Belchuk A. I. Sabelnikov L. V. Pharmaceuticals Imports in Russia. *Rossijskij vneshnee'konomicheskij vestnik.* 2021;(3):69–76. (In Russ.) DOI: 10.24411/2072-8042-2021-3-69-76.
16. Prosalova V. S., Getman O. V., Falaleev M. A., Sitdikova N. A. Development of Russian pharmaceutical market in conditions of coronavirus infection spread. *Azimut nauchnyx issledovanij: e'konomika i upravlenie*. 2021;34(1):259–263. (In Russ.) DOI: 10.26140/anie-2021-1001-0063.

ПАМЯТИ БОЯНА ЧАЛИЯ



1 июля 2022 г. на 39-м году жизни от тяжелой продолжительной болезни скончался член редколлегии с 2015 г. журнала «*Разработка и регистрация лекарственных средств*», доцент кафедры фармацевтической технологии и косметологии фармацевтического факультета фармации Университета Белграда (Сербия) **Боян Чалия (Bojan Čalija)**.

Доцент **Боян Чалия** родился 20.09.1982 г. в г. Сараево. В 2007 г. окончил факультет фармации в Университете Белграда, а в 2013 году защитил диссертацию на тему: *"Functionality of chitosans in formation of alginate-chitosan microparticles as carriers for nonsteroidal antiinflammatory drugs"*. Впоследствии, работая на кафедре фармацевтической технологии и косметологии, **Боян Чалия** преподавал студентам разделы по фармацевтической технологии и промышленной фармации, а также специальный элективный курс по новым лекарственным формам.

Боян Чалия являлся автором более 130 работ, из которых около 50 статей в изданиях, индексируемых международной базой Scopus, опубликованных в высокорейтинговых журналах в фармацевтической и химических областях. **Боян Чалия** принимал участие в рецензировании статей для более чем 25 журналов. Он является соавтором учебника по фармацевтической технологии и автором монографии "*Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits" (Elsevier, 2017)*.

Редколлегия журнала выражает глубочайшие соболезнования родным и близким выдающегося еще совсем молодого ученого, прекрасного человека и друга ***Бояна Чалия***.

АНАЛИТИКА ЭКСПО

21-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

11–14.04.2023

Москва, Крокус Экспо









Забронируйте стенд

analitikaexpo.com

ITE ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER

0+

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 науке:

- 14.04.01 – Технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.
2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

   Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – http://www.consort-statement.org

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате А4 Microsof Word (*doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: http://elibrary.ru

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдранол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-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-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, 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 алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте http://www.translit.ru

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychophar-macogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления 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 номеру рисунка.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®



Медиа-партнерство

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

В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

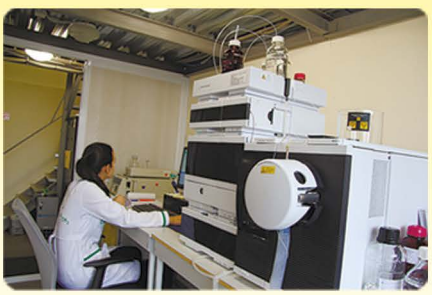
- *Публикации в печатном и электронном журнале*
  - Научные статьи
  - Рекламные статьи
  - Рекламные модули
- *Баннерная реклама на сайте*
  Размещение рекламных баннеров на сайте pharmjournal.ru
- *Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала*
- *e-mail-маркетинг (в базе 12000 + адресов)*
- *Участие в качестве спикера/экспонента в конференциях, организуемых нашим изданием*



О журнале

Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:

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







Включен в перечень ВАК, SCOPUS.

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









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

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

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®

Журнал является Open Access изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

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.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.2.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- ➢ Услуга комплексного перевода.
- ➢ Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- ➢ При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.





Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**

ТЕСТИРОВАНИЕ РАСТВОРЕНИЯ

NEW

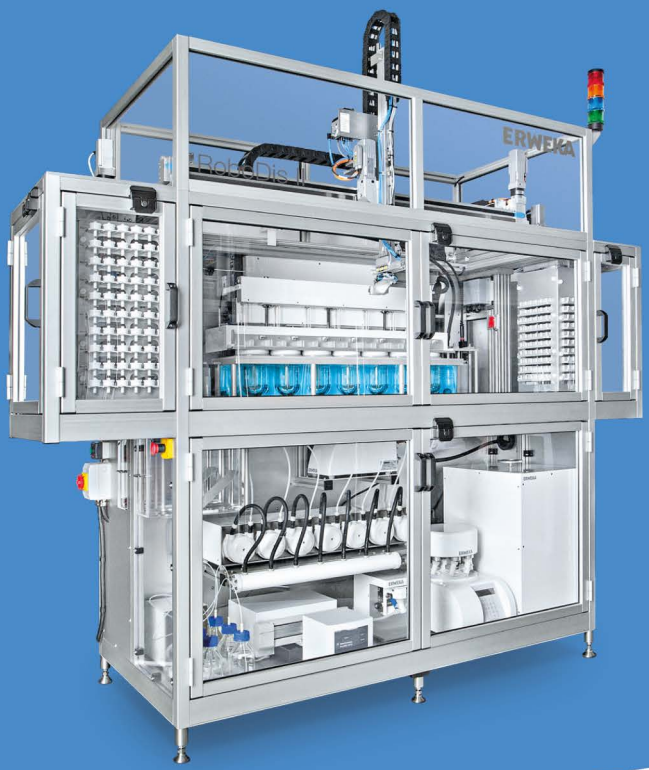
DT 950 Series

ЦИФРОВОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ
РАСТВОРЕНИЯ



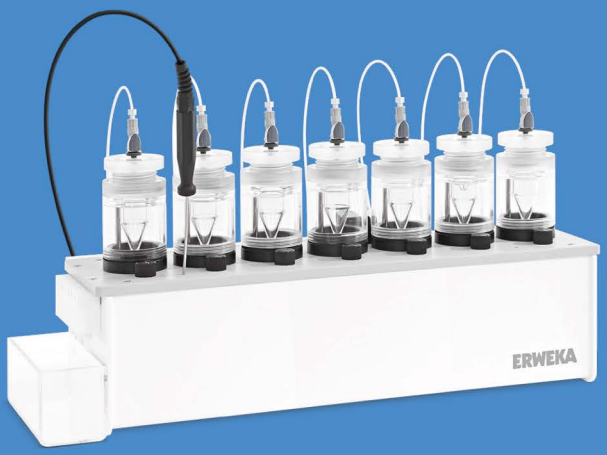
RoboDis II+

ПОЛНОСТЬЮ
АВТОМАТИЧЕСКОЕ
ТЕСТИРОВАНИЕ



USP 4 DFZ II

ТЕСТИРОВАНИЕ ПО МЕТОДУ
ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА



ООО „ЭРВЕКА“

115114 Москва
Летниковская 16-103

E-Mail: sales@erweka.ru
Тел.: +7 499 110 90 60

ERWEKA