

# РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ  
BAC Scopus®



Международный конгресс

## «Разработка и регистрация лекарственных средств»

ЦФА | центр  
фармацевтической  
аналитики

Подробности и регистрация

2–3 февраля 2023 года  
г. Москва  
offline + online





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)



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

Тел.: +7 (499) 281-81-11  
[www.cpha.ru](http://www.cpha.ru) E-mail: [info@cpha.ru](mailto: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 (Росаккредитация), № 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 противо-лекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

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



## **РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

**Научно-производственный журнал**

**2022. Том 11, № 4**

## **DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION**

**Research & production journal**

**2022. Volume 11, No. 4**

## **Цели и задачи журнала**

Научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

**Первый раздел** посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

**Второй раздел** – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления, от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов.

**Третий раздел** описывает аналитические методики контроля качества.

**Четвертый раздел** посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований.

**В пятом разделе** рассматриваются вопросы валидации методик, подготовки регистрационного dossier, 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 ФГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

**Ваизрова 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 ФГБОУ 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

**Малащенко 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

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

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

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

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

**Смехова И. Е.**, профессор кафедры технологии лекарственных форм. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

**Станишевский Я. М.**, д. х. н., проф., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

**Сукоян Г. В.**, д. б. н., Международный центр внедрения новых биомедицинских технологий, Тбилисский государственный университет имени Иванэ Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

**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 технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

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

<b>Учредители печатной версии</b>	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
<b>Учредители онлайн версии</b>	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
<b>Издатель</b>	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
<b>Директор журнала</b>	Кульджанова Н. В.
<b>Заведующий редакцией</b>	Михайлова Н. С.
<b>Основан</b>	Журнал издается с ноября 2012 г.
<b>Периодичность</b>	4 выпуска в год
<b>Префикс DOI</b>	10.33380
<b>ISSN print</b>	2305-2066
<b>ISSN online</b>	2658-5049
<b>Адрес редакции</b>	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. <a href="http://www.pharmjournal.ru">www.pharmjournal.ru</a> e-mail: <a href="mailto:info@pharmjournal.ru">info@pharmjournal.ru</a>
<b>Адрес типографии</b>	ООО «МАКС ПРЕСС» Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
<b>Копирайт</b>	© Разработка и регистрация лекарственных средств, 2022
<b>Условия распространения материалов</b>	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
<b>Тираж</b>	999 экземпляров
<b>Цена</b>	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 registracià 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 registracià 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

<b>Print version founders</b>	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, Moskovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
<b>Online version founders</b>	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
<b>Publisher</b>	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
<b>Journal director</b>	Natalia V. Kuldjanova
<b>Managing Editor</b>	Nadezhda S. Mikhaylova
<b>Founded:</b>	The journal has been published since November 2012.
<b>Frequency</b>	Quarterly
<b>DOI Prefix</b>	10.33380
<b>ISSN print</b>	2305-2066
<b>ISSN online</b>	2658-5049
<b>Editorial office address</b>	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia <a href="http://www.pharmjournal.ru">www.pharmjournal.ru</a> e-mail: <a href="mailto:info@pharmjournal.ru">info@pharmjournal.ru</a>
<b>Printing house address</b>	LLC "MAX PRESS" 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
<b>Copyright</b>	© Drug development & registration, 2022
<b>Content distribution terms</b>	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
<b>Circulation</b>	999 copies
<b>Price</b>	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

<b>От редакции .....</b>	10
<b>Мероприятия .....</b>	17
 <b>Поиск и разработка новых лекарственных средств</b>	
<b>Анти микробная активность водно-спиртовых экстрактов представителей рода <i>Potentilla</i> L.</b>	
Е. Е. Савельева, Н. А. Булгакова, Е. З. Лапкина, В. В. Черная, В. И. Курбатский .....	20
<b>Дереза: перспективы применения в фармации растительного сырья, содержащего алкалоиды, флавоноиды, полисахариды и другие биологически активные вещества растения семейства пасленовых (<i>Solanaceae</i>) (обзор)</b>	
Б. Тупа, О. Г. Потанина, Е. В. Успенская .....	28
<b>Получение каллусной культуры шалфея лекарственного (<i>Salvia officinalis</i> L.) и ее характеристика</b>	
Н. С. Пивоварова, Т. С. Шебитченко, О. Н. Абросимова .....	40
<b>Разработка прогнозной модели оценки запасов лекарственных растений с помощью средств ГИС на примере Среднего Урала</b>	
А. Ю. Турышев, В. Д. Белоногова, В. Г. Лужанин .....	47
<b>Хелидоновая кислота и ее дериваты: общий спектр биологической активности и остеогенные свойства (обзор)</b>	
Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, Е. Ю. Авдеева, С. В. Кривоцеков, И. А. Хлусов, М. В. Белоусов .....	60
 <b>Фармацевтическая технология</b>	
<b>Применение технологии твердой дисперсии для получения модели инъекционной лекарственной формы производного индолокарбазола</b>	
А. П. Колпаксиди, М. В. Дмитриева, О. Л. Орлова, Л. В. Эктора, И. И. Краснюк .....	73
<b>Глубокие эвтектические растворители на основе холина хлорида как перспективные экстрагенты флавоноидов из седативной растительной композиции</b>	
М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина .....	79
<b>Концентрирование рения-188 для синтеза радиофармацевтических препаратов на его основе</b>	
А. О. Малышева, Г. Е. Кодина, Е. А. Лямцева .....	87
<b>Impact of Parameter on Nanostructured Lipid Carrier Formulation and Approach of the Carrier for Cancer Treatment: a Brief Study</b>	
Laxmidhar Sahoo, Goutam Kumar Jena, Chandra Sekhar Patro .....	95
<b>Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества</b>	
К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, В. И. Павловский, А. Р. Алиев, А. В. Павловский, О. В. Иванова, Д. О. Цыренов, Е. В. Флисюк .....	108
<b>Разработка силиконовых форм, полученных с применением аддитивных технологий, для отливки ректальных суппозиториев</b>	
К. А. Гусев, О. А. Терентьева, Д. Н. Маймистов, Ю. Э. Генералова, К. О. Сидоров, Е. В. Флисюк .....	116
<b>Разработка состава и технологии шипучих таблеток с биологически активным комплексом аронии черноплодной (<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott) плодов</b>	
Н. С. Пивоварова, О. Н. Абросимова, Т. С. Шебитченко, Н. В. Сокращкина, А. А. Шмарова, Е. К. Новикова, К. О. Сидоров .....	125
<b>Разработка состава и технологии орально диспергируемых таблеток на основе этилтиобензимидазола фумарата</b>	
И. Д. Касымов, А. В. Басевич, А. Л. Марченко, В. А. Вайнштейн .....	134
<b>Применение подхода Quality-by-Design для обоснования состава и технологии двухкомпонентных суппозиториев</b>	
И. Е. Смехова, Л. В. Шигарова, П. И. Андреева, Е. В. Флисюк, А. С. Дзюба .....	142

**Проблемы нанесения пленочных покрытий при трансфере технологий**

А. В. Стрелкова, Е. В. Флисюк ..... 150

**Методы анализа лекарственных средств**

**Разработка препартивного способа получения энантиомерно чистой субстанции сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии**

В. Н. Царев, Н. Г. Базарнова, И. В. Микушина ..... 160

**Фитохимическое изучение травы вербейника обыкновенного (*Lysimachia vulgaris L.*): выделение и установление структуры вторичных метаболитов**

Е. М. Крипак, А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, Е. В. Жохова ..... 170

**Выделение индивидуальных соединений из травы сабельника болотного (*Comarum palustre L.*) и установление их структуры спектроскопическими методами**

Й. Стругар, А. А. Орлова, А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, М. Н. Повыдыш ..... 177

**Индивидуальные соединения корневищ и корней родиолы четырехлепестной (*Rhodoila quadrifida*): выделение и установление структуры**

А. В. Лёзина, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, И. И. Тернинко ..... 185

**Исследования по созданию стоматологического геля с ацизолом**

А. Л. Голованенко, И. В. Алексеева, Е. С. Березина, Е. В. Флисюк, У. В. Ногаева, И. А. Титович ..... 194

**Разработка методики количественного определения генистеина для аттестации стандартного образца**

А. А. Жигалина, О. Ю. Стрелова, А. Н. Гребенюк ..... 202

**Разработка и валидация методики определения подлинности рамиприла в экструдате и напечатанных таблетках**

В. В. Тихонова, О. А. Терентьева, К. А. Гусев, Е. В. Флисюк, Д. Н. Маймистов ..... 209

**Выделение, идентификация и количественное определение антраценпроизводных методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации**

А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова, Е. А. Малашенко, Е. В. Сергунова, Н. В. Бобкова ..... 216

**Доклинические и клинические исследования**

**Разработка и валидация определения элтромбопага в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС**

А. М. Аль-Дураиби, А. Л. Куликов, М. В. Покровский ..... 226

**Апробация модели жировой дистрофии печени, индуцированной оротовой кислотой**

В. Е. Ковансков, Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко, Г. А. Плиско, Е. А. Копачёва, К. О. Сидоров ..... 240

**Клиническая апробация нового наноколлоидного радиофармпрепарата [ $^{99}\text{mTc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  для диагностики сторожевых лимфатических узлов**

А. А. Медведева, В. И. Чернов, Р. В. Зельчан, О. Д. Брагина, А. Н. Рыбина, В. С. Скуридин, Е. С. Стасюк, С. Ю. Чижевская, А. В. Гольдберг, Е. Ю. Гарбуков ..... 246

**Прогностическая и предиктивная значимость экспрессии мРНК генов ABC-транспортеров у пациентов с немелкоклеточным раком легкого**

М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова, Е. О. Родионов, А. А. Фролова, С. В. Миллер, О. В. Черемисина, С. А. Тузиков, Н. В. Литвяков ..... 253

**Юбилей** ..... 261

## CONTENTS

<b>Introduction .....</b>	10
<b>Events .....</b>	17
 <b>Research and development of new drug products</b>	
<b>Antimicrobial Activity of Water-alcoholic Extracts of Representatives of the Genus <i>Potentilla</i> L.</b>	
Elena E. Savyelyeva, Nadezhda A. Bulgakova, Ekaterina Z. Lapkina, Vita V. Chernaya, Vladimir I. Kurbatsky .....	20
<b>Lycium: Prospects of Application in Pharmacy of Plant Raw Materials Containing Alkaloids, Flavonoids, Polysaccharides and Other Biologically Active Substances of the Solanaceae Family Plants (Review)</b>	
Bleona Tupa, Olga G. Potanina, Elena V. Uspenskaya .....	28
<b>Obtaining Callus Culture of Sage Medicinal (<i>Salvia officinalis</i> L.) and its Characteristics</b>	
Nadezhda S. Pivovarova, Tatyana S. Shebitchenko, Olesya N. Abrosimova .....	40
<b>Development of a Predictive Model for Estimating Stocks of Medicinal Plants Using GIS Tools on the Example of the Middle Urals</b>	
Aleksey Yu. Turyshev, Valentina D. Belonogova, Vladimir G. Luzhanin .....	47
<b>Chelidonic Acid and its Derivates: General Spectrum of Biological Activity and Osteogenic Properties (Review)</b>	
Larisa A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova, Elena Yu. Avdeeva, Sergei V. Krivoshchekov, Igor A. Khlusov, Mikhail V. Belousov .....	60
 <b>Pharmaceutical Technology</b>	
<b>Application of Solid Dispersion Technology to Obtain a Model of Injectable Dosage Form of Indolocarbazole Derivative</b>	
Alexander P. Kolpaksidi, Maria V. Dmitrieva, Olga L. Orlova, Lidia V. Ektova, Ivan I. Krasniuk .....	73
<b>Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents as Promising Extractants of Flavonoids from Sedative Plant Composition</b>	
Marina A. Dzhavakhyan, Yulia E. Prozhogina .....	79
<b>Concentration of Rhenium-188 for the Radiopharmaceutical Synthesis</b>	
Anna O. Malysheva, Galina E. Kodina, Elena A. Lyamtseva .....	87
<b>Impact of Parameter on Nanostructured Lipid Carrier Formulation and Approach of the Carrier for Cancer Treatment: a Brief Study</b>	
Laxmidhar Sahoo, Goutam Kumar Jena, Chandra Sekhar Patro .....	95
<b>Development of the Composition and Technology for Production a Solid Dispersion System by Hot Melt Extrusion to Increase the Bioavailability of the Active Substance</b>	
Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov, Victor I. Pavlovsky, Andrey R. Aliev, Alexander V. Pavlovsky, Olga V. Ivanova, Denis O. Tsyrenov, Elena V. Flisyuk .....	108
<b>Development of Suppositories Silicone Molds Using Additive Technologies</b>	
Konstantin A. Gusev, Oksana A. Terenteva, Denis N. Maimistov, Yuliya E. Generalova, Kirill O. Sidorov, Elena V. Flisyuk .....	116
<b>Development of Composition and Technology of Effervescent Tablets with Biologically Active Complex of Black Chokeberry (<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott) Fruits</b>	
Nadezhda S. Pivovarova, Olesya N. Abrosimova, Tatyana S. Shebitchenko, Natalya V. Sokrasnkina, Alexandra A. Shmarova, Ekaterina K. Novikova, Kirill O. Sidorov .....	125
<b>Development of the Composition and Technology of Orally Dispersed Tablets Based on Ethylthiobenzimidazole Fumarate</b>	
Ilya D. Kasymov, Anna V. Basevich, Alexei L. Marchenko, Victor A. Vainshtein .....	134
<b>Application of Quality-by-Design Approach to Justify the Composition and Technology of Two-component Suppositories</b>	
Irina E. Smekhova, Larisa V. Shigarova, Polina I. Andreeva, Elena V. Flisyuk, Anatoliy S. Dzyuba .....	142

**Problems of Applying Film Coatings During Scale-up Technology**

Anna V. Strelkova, Elena V. Flisyuk ..... 150

**Analytical Methods**

**Development of a Preparative Method for Obtaining an Enantiomerically Pure Substance of Salbutamol by Supercritical Fluid Chromatography**

Vitaly N. Tsarev, Natalya G. Bazarnova, Irina V. Mikushina ..... 160

**Phytochemical Analysis of *Lysimachia vulgaris* L. Aerial Part: Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites**

Ekaterina M. Kripak, Anastasiia O. Ponkratova, Andrei K. Whaley, Elena V. Zhokhova ..... 170

**Isolation of Individual Compounds from the Aerial Part of *Comarum palustre* L. and Their Structure Elucidation Using Spectroscopic Methods**

Yovana Strugar, Anastasia A. Orlova, Anastasiia A. Ponkratova, Andrei K. Whaley, Maria N. Povydysh ..... 177

**Individual Compounds of *Rhodoila quadrifida* Rhizomes and Roots: Isolating and Establishing Structure**

Alyona V. Lezina, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Whaley, Inna I. Terninko ..... 185

**Research on the Creation of Dental Gel with Acyzol**

Anna L. Golovanenko, Irina V. Alekseeva, Elena S. Berezina, Elena V. Flisyuk, Ulyana V. Nogaeva, Irina A. Titovich ..... 194

**Development of a Method for the Quantitative Determination of Genisten for the Certification of a Certified Reference Material**

Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova, Alexander N. Grebenyuk ..... 202

**Development and Validation of HPLC Method for Identification of Ramipril in Printed Tablets and Filaments**

Viktoria V. Tihonova, Oksana A. Terenteva, Konstantin A. Gusev, Elena V. Flisyuk, Denis N. Maimistov ..... 209

**Isolation, Identification and Quantitative Determination of Anthracene Derivatives by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus *Rumex* of Three Vegetation Times**

Andrey M. Poluyanov, Anna Yu. Sokolova, Evgeniya A. Malashenko, Ekaterina V. Sergunova, Natalia V. Bobkova ..... 216

**Preclinical and clinical study**

**Development and Validation of Eltrombopag Determination in Human Plasma Blood by HPLC-MS Method**

Abdullah M. AL-Dhuraibi, Alexandr L. Kulikov, Mikhail V. Pokrovskiy ..... 226

**Approbation of a Model of Fat Liver Disease Induced by Orotic Acid**

Vladislav V. Kovanskov, Dmitrij Yu. Ivkin, Evgeny D. Semivelichenko, Grigory A. Plisko, Ekaterina A. Kopacheva, Kirill O. Sidorov ..... 240

**Clinical Testing of a New Radiopharmaceutical [ $^{99}\text{mTc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  for the Diagnosis of Sentinel Lymph Nodes**

Anna A. Medvedeva, Vladimir I. Chernov, Roman V. Zelchan, Ol'ga D. Bragina, Anastasiya A. Rybina, Victor S. Skuridin, Elena S. Stasyuk, Svetlana Yu. Chizhevskaya, Aleksey V. Goldberg, Evgeniy Yu. Garbukov ..... 246

**Prognostic and Predictive Significance of mRNA Expression of ABC-transporter Genes in Patients with Non-small Cell Lung Cancer**

Matvey M. Tsyganov, Marina K. Ibragimova, Evgeny O. Rodionov, Anastasia A. Frolova, Sergey V. Miller, Olga V. Cheremisina, Sergey A. Tuzikov, Nikolay V. Litvyakov ..... 253

**Anniversary** ..... 261

## УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!



Главный редактор журнала И. Е. Шохин

Осенью 2022 года научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» отмечает юбилей: 10 лет со дня основания.

29–30 октября 2012 г. состоялось масштабное научное мероприятие, совместно организованное Первым МГМУ им. И. М. Сеченова и ГК «Фармконтракт»: II научно-практическая конференция с международным участием «Разработка и регистрация лекарственных средств: реализация стратегии Фарма-2020». За два дня мероприятия конференцию и выставку лабораторного оборудования постили более 700 слушателей, в программе конференции участвовали 30 докладчиков из Российской Федерации и более чем из 10 стран ближнего и дальнего зарубежья. Одним из значительных событий этой конференции была презентация нового рецензируемого научного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Спонсором и издателем журнала на тот момент являлась ГК «Фармконтракт» во главе с **Сергеем Быковским**. На следующий год в состав учредителей вошли ведущие медицинские вузы страны: Первый МГМУ им. И. М. Сеченова и СибГМУ. В редакционную коллегию вошли профессора ведущих медицинских и фармацевтических ВУЗов и исследовательских организаций. Должность главного редактора журнала со дня основания и по сей день занимает док-

тор фармацевтических наук **Игорь Евгеньевич Шохин**.

Первый выпуск журнала был посвящен лабораторным исследованиям лекарственных средств: тесту сравнительной кинетики растворения, процедуре «биовейвер», исследованиям биоэквивалентности, вопросам надлежащей лабораторной практики. Впоследствии тематика журнала существенно расширилась и стала охватывать все этапы жизненного цикла лекарственных средств: от ранней разработки до пострегистрационных изменений. Появились первые статьи по фармацевтической технологии и нанотехнологиям, аналитическим методикам контроля качества лекарственных средств, изучению лекарственного растительного сырья, доклиническим и клиническим исследованиям, регуляторным вопросам. Журнал публиковал результаты актуальных и качественных исследований как молодых ученых, так и уже создавших себе имя в научной среде международных коллективов с учеными мирового уровня в их составе.

В 2015 г. «Разработка и регистрация лекарственных средств» был включен 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» [специальности: 3.3.6. 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 приобретал все большую и большую популярность у представителей отечественной фармацевтической отрасли, неизменно выступая информационным партнером основных ключевых мероприятий, имеющих фармацевтическую тематику: выставок, конгрессов, конференций.

В 2018 г. журнал перешел в собственность и под управление ООО «Центр Фармацевтической Аналитики». Основным трендом политики развития журнала стало повышение уровня качества научных публикаций, выход на международную арену. Главным редактором была поставлена цель войти в международные библиографические базы данных. Безусловно, этой

цели нельзя было достичь без достойной издательской команды: появление в ее составе заведующей редакцией **Надежды Михайловой** существенно повысило уровень верстки и оформления издания, а назначение на должность директора журнала **Натальи Кульджановой** обеспечило устойчивое развитие и повысило маркетинговую активность. Свой неоценимый вклад в обеспечение допуска к печати научных публикаций только высокого качества внесли члены редакционной коллегии журнала и внешние рецензенты, со многими из которых журнал успешно сотрудничает в течение всех десяти лет жизни. Также в 2018 г. электронная версия журнала стала издаваться на платформе Elpub компании НЭИКОН для обеспечения соответствия международным издательским требованиям. И в 2020 г. «Разработка и регистрация лекарственных средств» достиг поставленных целей: состоялось международное признание журнала – включение и индексация в международной базе библиографических данных Scopus, а уже на следующий год в рейтинге журналов по фармацевтическим наукам журнал достиг третьего квартиля согласно показателям CiteScore и SJR.

**Drug Development and Registration**



В текущем 2022 г. журнал вошел и в «Белый список» журналов, сформированный межведомственной рабочей группой Минобрнауки.

Но редакция журнала не собирается останавливаться на достигнутом: впереди у нас много новых интересных задач и важных свершений!

Поздравляю с нашим Юбилеем редакцию, редакционную коллегию, внешних рецензентов, авторов и читателей.

Главный редактор, д. фарм. н.,  
генеральный директор ООО «ЦФА»  
**Игорь Евгеньевич Шохин**

УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

## Возрождение химической промышленности России в советский период (1917–1927 гг.). Часть 4

К. С. Гузев<sup>✉</sup>

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Гузев Константин Сергеевич. E-mail: guzev3@yandex.ru

### Резюме

В четвертой главе представлены воспоминания В. Н. Ипатьева о подготовке и праздновании 200-летия Российской академии наук и очередного Менделеевского съезда. О повторной зарубежной командировке с коммерческими и научными целями. За время этой поездки Ипатьеву удалось посетить большое количество знакомых химиков, руководителей химических факультетов немецких, французских, бельгийских университетов и лабораторий ведущих химических кафедр. Описана его научная деятельность в заключительный период его жизни в России, перед эмиграцией в Германию, а в последствии в США.

## Revival of the Russian chemical industry during the Soviet period (1917–1927). Part 4

Konstantin S. Guzev<sup>✉</sup>

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Konstantin S. Guzev. E-mail: guzev3@yandex.ru

### Abstract

The fourth chapter presents V. N. Ipatiev's memoirs about the preparation and celebration of the 200th anniversary of the Russian Academy of Sciences and the next Mendeleev Congress. About repeated foreign business trip with commercial and scientific purposes. During this trip, Ipatiev managed to visit a large number of familiar chemists, heads of chemical faculties of German, French, Belgian universities and laboratories of leading chemical departments. His scientific activity during the final period of his life in Russia, before emigrating to Germany, and later to the USA, is described.

В течение 1924–1925 гг. В. Н. Ипатьеву с коллегами пришлось решать важнейшую задачу по организации синтеза аммиака из кислорода и водорода воздуха. Для этого он убедил руководство ВСНХ в том, что аммиак представлял собой важное химическое соединение, применяемое как сырье при получении удобрений для сельского хозяйства и большого числа продуктов для военной промышленности. Затем Ипатьев организовал «Комиссию по связанному азоту», провел инспектирование европейских заводов по получению аммиака, выбрал компанию и организовал подготовку и подписание контракта с итальянской компанией, получающей аммиак по современному методу Казале.

В августе 1925 года Химический комитет сделал отчет о результатах своей двухлетней работы. Сотрудники комитета разработали новую противогазную маску, которая не пропускала никаких дымов; было заказано 100 тыс. таких масок. Была сделана полузаводская установка по получению горчичного газа (иприта), дающая до 12 пудов в день этого продукта;

в лабораториях подведомственных институтов было проведено значительное количество экспериментальных работ, позволивших приступить к планированию строительства заводской установки для получения этого удушающего газа.

В 1924 г. по инициативе В. Н. Ипатьева при Артиллерийской академии была организована особая химическая лаборатория по ядовитым газам и противогазам. Он же сумел найти деньги для ее организации. Обучавшиеся в академии красные командиры должны были в обязательном порядке пройти практические занятия по изучению методов получения ядовитых газов, их свойств и методов защиты от них. Позднее Ипатьеву удалось организовать проведение научных работ, выполняемых слушателями, для получения звания военного артиллерийского инженера.

В 1925 г. исполнилось 200 лет Российской академии наук. Правительство РСФСР решило отпраздновать эту дату и собрать не только крупных отечественных, но и ведущих зарубежных ученых. Было решено отпустить Академии наук соответствующие кре-

диты, чтобы показать зарубежным коллегам, как в России ценят отечественную науку. Основные торжества запланировали на сентябрь – очень удобное время, когда большинство предполагаемых гостей свободны от преподавания в своих университетах. К началу празднования в Ленинград приехало до 200 иностранных гостей, и было получено более 400 поздравительных телеграмм. Само празднование было очень помпезным: для него арендовали Колонный зал Дома профсоюзов, члены Академии наук сидели на сцене, гости – в первых рядах партера, за сценой располагался оркестр. Первое поздравление, от правительства СССР, произнес всероссийский староста М. И. Калинин. После его речи оркестр под управлением знаменитого композитора А. К. Глазунова сыграл Интернационал, и специально написанную к этому торжеству сонату. Затем были сказаны речи и зачитаны наиболее важные телеграммы. Вечером состоялся банкет, в котором приняли участие более тысячи человек. По мнению В. Н. Ипатьева, «яства и вина были великолепны и по своим качествам ничем не отличались от довоенного времени». На другой день были устроены экскурсии по городу, институтам и лабораториям. Ленсовет также устроил торжественное заседание в Таврическом дворце, куда были приглашены зарубежные гости. После заслушивания речей гости и приглашенные отправились в Москву. В Москве гости осматривали достопримечательности, а затем советское правительство устроило прощальный банкет в Колонном зале Дома Союзов. По мнению участников банкета, он был роскошный, шампанское лилось рекой, икра и закуски были замечательные. Было произнесено множество речей и тостов, зарубежные гости сердечно благодарили хозяев на радушный прием. А. В. Луначарский сказал речь на 5 языках, один из которых был латинский, чем вызвал бурю аплодисментов. Гости-химики остались в Москве еще на несколько дней, так как на другой день открывался очередной Менделеевский съезд. На этот съезд приехало около 1500 человек, а на его открытие и первое заседание пришли более 2000 человек. Громадный зал Московской консерватории был переполнен. В состав президиума вошли члены правительства. Приветственную речь сказал Л. Д. Троцкий, после него слово предоставили В. Н. Ипатьеву. Выступали и зарубежные гости. Сообщения, касающиеся научных достижений отечественных и зарубежных химиков, были сделаны в зале Карповского института и в Большом зале Политехнического музея. Таким образом, и торжество, посвященное 200-летию Российской академии наук, и очередной Менделеевский съезд прошли великолепно и остались после себя хорошее впечатление у отечественных и зарубежных гостей.

В 1925 г. СССР получил кредит в 300 млн марок на приобретение различного оборудования для российских заводов. Была создана комиссия, утвердившая специальную смету для пользования этим

кредитом, которая после утверждения ее правительством приводилась в исполнение через Берлинское торгпредство.

В 1926 г. правительство приняло решение о строительстве нового Института прикладной минералогии и металлургии. Были отпущены кредиты на строительство здания, в выделении которых большую роль сыграл В. Н. Ипатьев. В этом же году было окончательно сформировано Главное химическое управление, на заседаниях которого обсуждались важнейшие проблемы химической промышленности, а также деятельность (отчеты и планы) всех химических трестов. Для наблюдения за выполнением российского заказа по проектированию и строительству установки для получения аммиака в Италию были отправлены наши инженеры. Была согласована командировка В. Н. Ипатьева за границу с целью поиска оптимальной установки для производства цианамида кальция в России. В Германии с руководством фирмы Stickstoff Werke прошли переговоры о покупке лицензии на изготовление кальция цианамида. Во Франции была проведена встреча по вопросу закупок и организации производства красок для ткацкой промышленности с проф. И. Е. Фрессаром – другом и помощником В. Н. Ипатьева по работе в Химическом комитете во время войны. Для окончательного решения вопроса о закупке красителей во Францию должна была поехать группа российских специалистов, которая на самом деле с той же целью в полном составе отправилась в США. Эта информация должна была встревожить французских коллег и привести к снижению их требований. Во Франции удалось еще раз осмотреть завод Фрессара, на котором производились красители, завод Клодта, специализировавшийся на получении аммиака под давлением 1000 атм., и завод по синтезу аммиака Comargue et Co<sup>o</sup>. По возвращении в Германию В. Н. Ипатьев посетил завод Фришера, на котором он ознакомился с работой установки по поглощению окислов азота и получению из них азотной кислоты. Перед поездкой в Россию Ипатьев заехал в Швецию, где посетил завод, принадлежащий Обществу суперфосфатных заводов по получению цианамида кальция. Это предприятие произвело на В. Н. Ипатьева наиболее благоприятное впечатление, да и цена за лицензию на их способ получения продукта была значительно ниже, чем у других компаний. Также Ипатьев со своими коллегами посетил завод доктора Коуперса (г. Дюссельдорф) по производству огнеупорного кирпича, который заслужил всемирную славу и пользовался огромным спросом. Процесс выработки кирпичей произвел на В. Н. Ипатьева неизгладимое впечатление. Он пишет: «Каждый сырой кирпич особой шихты (состава) подвергается сушке и нагреванию в течение шести недель в особой громадной печи, в которой имеются различные температуры до 1400 °C включительно. При помощи бесконечного полотна кирпичи медленно продвигаются по длине печи, достигая самой высокой температуры, а затем медленно охлаждаются».

Таким образом, за время этой насыщенной командировки Ипатьев посетил большое количество знакомых химиков, руководителей химических факультетов немецких, французских, бельгийских университетов и лабораторий ведущих химических кафедр.

Можно назвать еще несколько проектов по развитию химической промышленности, в которых Ипатьев принимал активное участие. Так, в СССР было два треста, занимающихся производством красителей – Анилин-трест в Москве и Южный красочный трест в Донецком бассейне. Для того чтобы определить, где выгодней производить нафтол (основной продукт для синтеза красителей), установки по получению этого вещества, согласно рекомендации Ипатьева, были установлены на обоих производствах. Благодаря его советам в США были закуплены лицензия на получение аммиака современным способом, а затем и соответствующая промышленная установка. При участии Ипатьева довольно быстро была начата разработка Соликамского месторождения залежей калиевых солей. В дальнейшем, по результатам, полученным при проведении необходимых геологоразведочных работ, это месторождение было причислено к самым богатым в мире. В результате в течение нескольких лет в СССР была налажена добыча калиевых солей, и с 1932 г. страна перестала их закупать за рубежом.

В конце 1926 года В. Н. Ипатьев был отстранен от ответственных должностей в НТО и ВСНХ, что позволило ему сосредоточится на научной работе. В Институте прикладной химии были выделены две комнаты для налаживания исследовательских работ под высоким давлением. Ипатьев убедил руководство института в необходимости их проведения, так как они представляли повышенный интерес для химиков всего мира. В течение 1926–1927 гг. все организационные проблемы были решены, и уже в следующем году был основан Институт высоких давлений, кото-

рый вскоре приобрел самостоятельный статус, отделившись от Института прикладной химии. Создание этого института и руководство им стало, пожалуй, последним наиболее крупным организационным делом В. Н. Ипатьева. Последующие три года, до окончательного отъезда из России в эмиграцию, Владимир Николаевич посвятил научной работе в России и Германии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере жизни В. Н. Ипатьева в период с 1917 до 1927 гг. можно проследить те шаги, которые сделала молодая Советская республика для восстановления отечественной химической промышленности в первые, наиболее тяжелые, 10 лет.

Отчетливо видно, что правительство большевиков очень быстро осознало важность восстановления промышленности вообще, и химической промышленности в частности, как важнейшей составной части оборонного комплекса страны. Организация ВСНХ и в дальнейшем Госплана позволила, не теряя времени, приступить к восстановлению предприятий, разрушенных во время двух революций и гражданской войны, а также к строительству новых, необходимых в тот период, заводов и фабрик. Серьезное отношение к восстановлению химической промышленности можно увидеть и по перечню лиц, с которыми В. Н. Ипатьеву пришлось сотрудничать по решению наиболее важных вопросов в его работе (таблица 1).

Обращает на себя внимание бережное отношение руководства страны к старым кадрам – сотрудникам ГАУ, Химического комитета, академикам Российской академии наук, профессорам и сотрудникам кафедр сохранившихся институтов и частных лабораторий, руководству и инженерному составу промышленных предприятий, активно участвовавшим в восстановлении работы учебных и научных учреждений, фабрик и заводов химической отрасли.

**Таблица 1. Государственные деятели Советской России, которые вместе с В. Н. Ипатьевым участвовали в восстановлении отечественной химической промышленности**

**Table 1. Statesmen of Soviet Russia who, together with V. N. Ipatiev, participated in the restoration of the domestic chemical industry**

п/п р/р	ФИО last name, first name	Должность Post
1	Богданов Петр Алексеевич Peter A. Bogdanov	Секретарь президиума ВСНХ (1920 г.) Secretary of the Presidium of the Supreme Economic Council (1920)
2	Бухарин Николай Иванович Nikolai I. Bukharin	Кандидат в члены Политбюро ЦК РКП(б) (1919 г.). Подготовил предложения по национализации промышленности и созданию органов управления экономикой во главе с Высшим советом народного хозяйства (ВСНХ) (1919–1920 гг.). Candidate for the Politburo of the Central Committee of the RCP (b) (1919). Prepared proposals for the nationalization of industry and the creation of economic management bodies headed by the Supreme Council of the National Economy (VSNH) (1919–1920)
3	Вернадский Владимир Иванович Vladimir I. Vernadsky	Академик Российской академии наук (1918 г.) Academician of the Russian Academy of Sciences (1918)
4	Горбунов Николай Петрович Nikolai P. Gorbunov	Секретарь В. И. Ленина, председатель Научно-технического совета (1918 г.) Secretary of V. I. Lenin, Chairman of the Scientific and Technical Council (1918)
5	Горький Алексей Максимович Alexey M. Gorky	Советский (пролетарский) писатель Soviet (proletarian) writer

Продолжение таблицы 1

п/п p/p	ФИО last name, first name	Должность Post
6	Карпов Лев Яковлевич Lev Ya. Karpov	Начальник химической промышленности послереволюционной России (1917 г.). Председатель химического отдела ВСНХ (1920 г.) Head of the Chemical industry of post-revolutionary Russia (1917). Chairman of the Chemical Department of the Supreme Economic Council (1920)
7	Кедров Михаил Сергеевич Mikhail S. Kedrov	Административное руководство Военным Советом (1918 г.) Administrative management of the Military Council (1918)
8	Коллонтай Александра Михайловна Kollontaj Aleksandra M.	Полномочный представитель в Норвегии (1920 г.), а затем в Швеции Plenipotentiary Representative in Norway (1920), and then in Sweden
9	Красин Леонид Борисович Leonid B. Krasin	Руководитель Комиссариата Внешней торговли (1918 г.). Полномочный представитель Советской России в Англии, руководитель торгпредства в Англии (1919–1921 г.) Head of the Commissariat of Foreign Trade (1918). Plenipotentiary representative of Soviet Russia in England, head of the trade mission in England (1919–1921)
10	Кржижановский Глеб Максимилианович Gleb M. Krzhizhanovskij	Председатель электрического комитета (1920 г.). Председатель Госплана (1921 г.). Председатель концессионного комитета при Госплане РСФСР (1922 г.) Chairman of the Electric Committee (1920). Chairman of the Gosplan (1921). Chairman of the Concession Committee under the Gosplan of the RSFSR (1922)
11	Куйбышев Валериан Владимирович Valerian V. Kujbyshev	Член Президиума ВЦСПС (1920 г.), руководил экономическим отделом. С 1921 член Президиума ВСНХ, начальник Главэлектро; руководил практическим осуществлением плана ГОЭЛРО (1921 г.). Председатель ВСНХ (1926 г.) Member of the Presidium of the All-Russian Central Committee (1920), headed the economic department. Since 1921, member of the Presidium of the Supreme Economic Council, Head of Glavelektro; supervised the practical implementation of the GOELRO plan (1921). Chairman of the Supreme Economic Council (1926)
12	Ландау Б. А. B. A. Landau	Руководитель Концессионного комитета (1922 г.). Председатель Анилин-треста (1926 г.) Head of the Concession Committee (1922). Chairman of the Anilin Trust (1926)
13	Литвинов Максим Максимович Maksim M. Litvinov	Дипломатический представитель Советской России в Великобритании, уполномоченный Народного Комиссариата иностранных дел, полномочный представитель РСФСР в Великобритании (1918 г.) Diplomatic representative of Soviet Russia in Great Britain, Commissioner of the People's Commissariat for Foreign Affairs, Plenipotentiary Representative of the RSFSR in Great Britain (1918)
14	Луначарский Анатолий Васильевич Anatolij V. Lunacharskij	С 1917 г. нарком просвещения. С 1929 г. председатель Ученого комитета при ЦИК СССР Since 1917, the People's Commissar of Education. Since 1929, Chairman of the Scientific Committee at the CEC of the USSR
15	Подвойский Николай Ильич Nikolaj I. Podvojskij	Комиссар по военным делам. Член советского правительства (1918 г.) Commissioner for Military Affairs. Member of the Soviet government (1918)
16	Пятаков Юрий Леонидович Yurij L. Pyatakov	Главный комиссар Государственного банка (декабрь 1917 г.). Главный комиссар Народного банка РСФСР (октябрь – ноябрь 1918 г.). Председатель Центрального правления каменноугольной промышленности Донбасса, начальник Главного управления по топливу, заместитель председателя Госплана и ВСНХ, председатель Главного концессионного комитета, торгпред СССР во Франции (1920–1926 гг.). Управляющий Государственным народным банком (1926–1927) Chief Commissioner of the State Bank (December 1917). Chief Commissioner of the People's Bank of the RSFSR (October – November 1918). Chairman of the Central Board of the Donbass Coal Industry, Head of the Main Fuel Department, Deputy Chairman of the State Planning Committee and the Supreme Economic Council, Chairman of the Main Concession Committee, Trade Representative of the USSR in France (1920–1926). Manager of the State People's Bank (1926–1927)
17	Рыков Алексей Иванович Aleksej I. Rykov	Председатель президиума ВСНХ (1920 г.). Заместитель В. И. Ленина в Совнарко- ме (1921–1922 гг.) Chairman of the Presidium of the Supreme Economic Council (1920). Deputy V. I. Lenin in the Council of People's Commissars (1921–1922)
18	Середа Семен Пафнутьевич Semen P. Sereda	Народный комиссар земледелия (1920 г.) People's Commissar of Agriculture (1920)
19	Склянский Эфраим Маркович Efraim M. Sklyanskij	Заместитель Л. Д. Троцкого, руководитель Технического управления (1918 г.) Deputy of L. D. Trotsky, Head of the Technical Department (1918)

п/п p/p	ФИО last name, first name	Должность Post
20	Троцкий Лев Давидович Lev D. Trockij	Председатель Реввоенсовета (1918 г.). Военный комиссар (1920 г.). Председатель Главного Концессионного комитета (1926 г.). Chairman of the Revolutionary Military Council (1918). Military Commissar (1920). Chairman of the Main Concession Committee (1926)
20	Фрунзе Михаил Васильевич Mihail V. Frunze	Председатель Революционного военного Совета (1923 г.) Chairman of the Revolutionary Military Council (1923)
22	Чичерин Георгий (Юрий) Васильевич Georgij (Yurij) V. Chicherin	Народный комиссар по иностранным делам (1918 г.). В апреле 1922 года возглавил советскую делегацию на Генуэзской конференции, во время конференции подписал с германским министром иностранных дел Вальтером Ратенау Раппальский договор People's Commissar for Foreign Affairs (1918). In April 1922, he headed the Soviet delegation to the Genoa Conference, during which he signed the Rapallo Treaty with German Foreign Minister Walter Rathenau
23	Ягода Генрих Григорьевич Genrih G. Yagoda	Комендант г. Москвы (1918 г.). Член коллегии ГПУ (1925 г.) Commandant of Moscow (1918). Member of the GPU Board (1925)

Проведя национализацию конкретных предприятий и целых отраслей промышленности, правительство РСФСР, а потом и СССР, всячески старалось восстановить их работу. Для этого сначала была проведена их полная инвентаризация, а в дальнейшем неоднократно предпринимались попытки внедрения новой формы управления этими предприятиями: создавая Главки и преобразуя их в Тресты, правительство не упускало возможности заставить по-новому функционировать национализированные предприятия. Финансовая поддержка зарождающейся промышленности обеспечивалась новыми банковскими структурами.

Не были забыты и отечественные ученые. Поддержка членов Академии наук России и профессорско-преподавательского состава институтов пайками, деньгами, научными командировками, организацией новых институтов и лабораторий не дала заахнуть отечественной науке. Особое отношение было у руководителей страны и к образованию. Народный комиссариат просвещения, отвечавший за работу начальной, средней и высшей школы, выпускал множество декретов, в которых, как мог, преобразовывал эту сферу деятельности. Открытие специальных издательств по выпуску учебников и журналов и таких государственных организаций, как «Бюро иностранной научно-технической помощи СССР» и «Международная книга», несомненно способствовало распространению научных знаний среди молодежи. Поддержка и субсидирование сохранившихся институтов и частных лабораторий также способствовали восстановлению химической промышленности. Организованные по предложению В. Н. Ильинова ежегодные отчетные конференции подведомственных химической индустрии институтов позволили оптимизировать их деятельность и направлять ее на решение наиболее востребованных тем.

Большое политическое значение имело проведение за счет средств ВСНХ Менделеевских чтений и празднование 200-летия Российской академии наук. Приглашение для участия в этих событиях ведущих зарубежных ученых и проведение научных сессий, совещаний, экскурсий и банкетов всему миру показали отношение правительства к отечественным ученым.

Развитие концессионных отношений с прежними владельцами предприятий дало мощный толчок в развитии ослабленных производств. Кредиты, оборудование и технологии видоизменили имеющиеся производства, дали возможность поднять производительность труда и расширить номенклатурный список получаемых продуктов. Сохранившиеся прежние и вновь возникшие связи между отечественными специалистами и специалистами, эмигрировавшими за рубеж, также облегчили налаживанию взаимодействия между людьми, компаниями и странами.

Не совсем удачная попытка создания общественной организации «ДоброХим» все же стимулировала внедрение знаний о химии в народные массы.

Важная роль Германии в воссоздании химической промышленности России. Благодаря Раппальскому договору Германия начала сотрудничество с Россией, как в области вооружения, так и в области химического синтеза. Имеется в виду не только строение заводов по получению ядовитых газов, но и, как следствие, разработка и производство улучшенной отечественной модели противогаза.

Таким образом, меры, принятые правительством РСФСР, а потом и СССР в период с 1917 по 1927 гг., позволили довольно быстро приступить к реальному восстановлению химической промышленности и подготовить эту отрасль к последующей индустриализации.

Информационная статья / Informational article

## 27 сентября в рамках форума OpenBio состоялся круглый стол, посвященный ранней разработке лекарственных средств в РФ – фармразработка: нулевая фаза

В рамках круглого стола эксперты обсудили существующие в нашей стране возможности для ранней разработки ЛС, поделились с какими сложностями сталкиваются разработчики и предложили варианты преодоления существующих барьеров.

### A Round Table Devoted to the Early Phase of Pharmaceutical Development was Held in Novosibirsk as a Part of OpenBio-2022 Forum

Experts discussed current opportunities for pharmaceutical development in our country, discussed actual difficulties and the ways for overcoming it.



В рамках круглого стола эксперты обсудили существующие в нашей стране возможности для ранней разработки ЛС, поделились с какими сложностями сталкиваются разработчики и предложили варианты преодоления существующих барьеров.

Текущая геополитическая ситуация формирует новые вызовы и провоцирует на более активный поиск необходимых решений. Отрасль столкнулась с рядом проблем – это и сворачивание клинических исследований иностранными фармацевтическими компаниями, трудности с логистикой фармацевтических субстанций, оборудования для их производства, расходных материалов, комплектующих. Все эти вопросы требуют ответных действий со стороны отрасли.

Так, **Иванов Роман Алексеевич**, проректор по научно-технологическому развитию Университета «Сириус», директор центра трансляционной медицины, рассказал про платформенное решение для быстрого реагирования на биологические угрозы.

Предлагается разработать унифицированную биотехнологическую производственную платформу, позволяющую сократить время на разработку и внедрение в производство разрабатываемых биотехнологических препаратов, масштабирование производства, облегчающую трансфер технологий на новые производственные площадки, а также позволяющую стан-

дартизовать номенклатуру используемого сырья и материалов.

Модульный характер производственной платформы должен обеспечивать быструю сборку отдельных блоков чистых помещений со стандартным набором оборудования, соответствующих этапам технологического процесса, подключение модульных конструкций к инженерным сетям на заранее подготовленных площадках. Он также должен обеспечивать возможность замены в модулях того или иного оборудования или добавления модулей, специфичных для процесса производства отдельных видов лекарственных препаратов, а также возможность быстрого кратного увеличения производственных мощностей.

**Шурыгин Михаил Геннадьевич**, д. м. н., директор по науке и инновационной деятельности АО «Фармасинтез» привел пример эффективного взаимодействия между наукой и бизнесом в западных фармацевтических компаниях. Михаил Геннадьевич отметил, что вопросы разработки препаратов должны быть вынесены за пределы фарм. компаний, что позволит существенно снизить затраты на разработку инновационных ЛС и повысить рентабельность производства, а также откроет дорогу инновациям в нашей стране, что, безусловно, является стратегически значимой задачей на сегодняшний день.

Спикеры единогласно отметили существующий на сегодня разрыв между наукой и бизнесом. Подавляющее большинство идей, рождающихся в стенах научно-исследовательских институтов, так и остаются на бумаге по ряду причин – это и гонка за количеством публикаций в научных журналах, а не дальнейшая реализуемость разработки и заинтересованность в ней индустриального партнера. Это и серьезный разрыв в технологическом оснащении научно-исследовательских лабораторий, что приводит к невозможности масштабировать разработанную технологию в промышленное производство. Это зачастую незнание патентного законодательства и не готовность авторов получать патенты на разработки. Все вышеперечисленные причины приводят к тому, что все без исключения фармацевтические компании в нашей стране вынуждены иметь собственные R&D подразделения, занимающиеся разработками новых препаратов. Это проблема, которая требует решения на законодательном уровне, и сопряжена с глобальной сменой ориентиров при постановке научно-исследовательских задач.

Директор Института трансляционной медицины и биотехнологии Сеченовского Университета, **Тарасов Вадим Владимирович**, д. фарм. н. в свою очередь поделился решением для оценки привлекательности научной разработки для бизнеса. Специалисты Сеченовского университета разработали обучающий курс для молодых ученых, в рамках которого разработчикам предоставляют механизмы для самостоятельной оценки привлекательности своей разработки. Это позволит молодым ученым еще на старте оценить инвестиционную привлекательность проекта, и скорректировать направление движения или вовсе отказаться от дальнейшей реализации проекта ввиду нецелесообразности.

**Закирова Светлана Анатольевна**, заместитель Генерального директора по разработкам и исследованиям, член Правления «Нанолек» представила взгляд на проблему со стороны производителя фармацевтических препаратов. Компания «Нанолек» делает ставку на собственные разработки и уже объявила план инвестировать в производство полного цикла на заводе в Кировской области и R&D центр в Москве. Компания начала работать над тем, чтобы заранее обеспечить людям защиту от новых инфекций и социально значимых заболеваний (онкологические, орфанные). «Производство полного цикла и R&D – это большие и долгосрочные инвестиции. Но важно не забывать, что есть много других инфекций, помимо Covid-19, которые могут пошатнуть стабильность мирового порядка», – отметила в своем докладе **Светлана Анатольевна**. В 2020 году на «Нанолек» пришлось 20 % от государственных закупок вакцин, входящих в НКПП – национальный календарь педиатрических прививок. Всего государство потратило на вакцины для календаря 26,6 млрд руб., из них на вакцины производства «Нанолек» около 5,4 млрд руб.

**Прокофьев Александр Владимирович**, руководитель отдела разработки продукта, департамента разработки генотерапевтических препаратов, BIOCAD поделился опытом и достижениями российской биофармацевтической компании BIOCAD в части разработки генотерапевтических препаратов на основе AAV. Компания BIOCAD с 2016 г. активно занимается разработкой собственных генотерапевтических препаратов на основе rAAV. На данный момент в компании созданы все необходимые платформенные технологии для создания подобного класса препаратов. На сегодняшней день в генотерапевтическом пайплайне компании BIOCAD уже есть несколько препаратов, которые успешно прошли цикл ранней разработки. Так, например, недавно было получено разрешение на проведение 1 фазы клинических исследований генотерапевтического препарата на основе AAV для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА). Также компания завершила доклинические исследования препарата на основе AAV для терапии гемофилии В и готовит документы для получения разрешения на проведение клинических исследований.

Завершал сессию доклад **Архипова Сергея Григорьевича**, к. х. н., старшего научного сотрудника ЦКП СКИФ. Сергей Григорьевич представил уникальную в России и одну из немногих в мире разработку новосибирских ученых.

Центр коллективного пользования «Сибирский кольцевой источник фотонов» Института катализа СО РАН – проект класса «мегасайенс» с синхротроном поколения «4+», который строится в новосибирском наукограде Кольцово.

Уникальные характеристики нового синхротрона позволят проводить передовые исследования с яркими и интенсивными пучками рентгеновского излучения во множестве областей — химии, физике, материаловедении, биологии, геологии, гуманитарных науках. Также СКИФ поможет решить актуальные задачи инновационных и промышленных предприятий.

Подводя итог, модератор сессии **Кульджанова Наталья Вячеславовна**, директор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» отметила: «В нашей стране есть как интересные разработки, так и ресурсы для решения такой стратегически важной задачи, как лекарственная независимость. Безусловно это длительная и трудоемкая задача, требующая перестройки многих привычных и отложенных процессов, это, своего рода, выход из зоны комфорта, что по итогу сделает нас сильнее и независимее».

Девятый форум наук о жизни OpenBio прошел в наукограде Кольцово Новосибирской области 27–30 сентября. В работе научной конференции и делового форума приняли участие более 5 тыс. человек. На OpenBio-2022 работали 800 онлайн-участников, 4500 человек присоединились к площадкам онлайн. На мероприятии работали специалисты из 55 регионов России и 14 стран мира.



GxP

ФОРМАТ  
ОНЛАЙН



06-09  
ДЕКАБРЯ  
2022 Г.

# ФОРУМ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО ВАЛИДАЦИИ

ПРОГРАММА И РЕГИСТРАЦИЯ:





Оригинальная статья / Research article

## Антибиотическая активность водно-спиртовых экстрактов представителей рода *Potentilla* L.

Е. Е. Савельева<sup>1</sup>, Н. А. Булгакова<sup>1</sup>✉, Е. З. Лапкина<sup>1</sup>, В. В. Черная<sup>2</sup>, В. И. Курбатский<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» (КрасГМУ имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого), 660022, Россия, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства», 660037, Россия, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Коломенская, д. 26

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (ТГУ), 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

✉ Контактное лицо: Булгакова Надежда Анатольевна. E-mail: bulgakovana@bk.ru

ORCID: Е. Е. Савельева – <https://orcid.org/0000-0002-6963-5851>; Н. А. Булгакова – <https://orcid.org/0000-0002-3512-6573>; Е. З. Лапкина – <https://orcid.org/0000-0002-7226-9565>; В. В. Черная – <https://orcid.org/0000-0002-1809-3773>; В. И. Курбатский – <https://orcid.org/0000-0002-8303-2045>.

Статья поступила: 30.11.2021

Статья принята в печать: 01.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Формирующаяся резистентность бактерий к лекарственным препаратам является одной из серьезных проблем медицины, которая стимулирует постоянный поиск новых антибиотических препаратов, также и природного происхождения. Исследователи широко обращаются к представителям различных семейств и родов растительного мира, используя различные морфологические группы растительного сырья, изучая действие как суммы извлекаемых веществ, так и индивидуальных соединений.

**Цель.** Исследование антибиотической активности водно-спиртовых экстрактов некоторых представителей рода *Potentilla* в рамках поиска новых антибиотических лекарственных средств растительного происхождения.

**Материалы и методы.** Объектами исследования являлись экстракты на 40%-м и 70%-м этиловом спирте из надземной части лапчатки гусиной *Potentilla anserina* L., лапчатки прямостоячей *P. erecta* (L.) Raesch, лапчатки серебристой *P. argentea* L., лапчатки странной *P. paradoxa* Nutt. ex Torr. et Gray, лапчатки Гольдбаха *P. goldbachii* Rupr., лапчатки сближенной *P. approximate* Bunge, лапчатки золотистоцветковой *P. chrysanthia* Trevir. Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков. В качестве тест-культур применяли коллекционные штаммы бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA) и 29 штаммов MSSA, выделенных из биоматериала от пациентов. Чувствительность штаммов MSSA к антибиотикам характеризовали антибиотикограммой.

**Результаты и обсуждение.** Штамм *Escherichia coli* оказался нечувствителен ко всем экстрактам лапчаток. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* минимально чувствителен к экстрактам на 40%-м этиловом спирте *P. anserina* и *P. argentea*, к 40%-м и 70%-м экстрактам *P. approximate*. Все штаммы *Staphylococcus aureus* (MSSA) чувствительны ко всем экстрактам лапчаток в разной степени. Среди 40%-х экстрактов наиболее активны экстракты *P. anserina*, *P. paradoxa* и *P. erecta*, среди 70%-х экстрактов – экстракты *P. paradoxa* и *P. argentea*.

**Заключение.** Исследуемые экстракты лапчаток проявили антибиотическую активность в отношении как чувствительных, так и нечувствительных к антибиотикам штаммов *Staphylococcus aureus* (MSSA) в близкой или сравнимой степени, при этом экстракты на 40%-м этиловом спирте несколько более активны по сравнению с экстрактами на 70%-м этиловом спирте. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности изучаемых видов лапчаток для дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** *Potentilla*, фенольные соединения, антибиотическая активность, *Staphylococcus aureus*

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

**Вклад авторов.** Е. Е. Савельева разработала концепцию и дизайн исследования, написала текста. Н. А. Булгакова выполнила получение экстрактов, редактирование. Е. З. Лапкина осуществила статистическую обработку данных. В. В. Черная выполнила планирование и проведение эксперимента, интерпретация результатов. В. И. Курбатский осуществил сбор, определение и обработка растительного сырья.

**Для цитирования:** Савельева Е. Е., Булгакова Н. А., Лапкина Е. З., Черная В. В., Курбатский В. И. Антибиотическая активность водно-спиртовых экстрактов представителей рода *Potentilla* L. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):20–27. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-20-27>

## Antimicrobial Activity of Water-alcoholic Extracts of Representatives of the Genus *Potentilla* L.

Елена Е. Савельева<sup>1</sup>, Надежда А. Булгакова<sup>1</sup>✉, Екатерина З. Лапкина<sup>1</sup>, Вита В. Черная<sup>2</sup>, Владимир И. Курбатский<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Prof. V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, 1, Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russia

<sup>2</sup> Federal Siberian Research Clinical Centre under the Federal Medical Biological Agency, 26, Kolomenskaya str., Krasnoyarsk, 660037, Russia

<sup>3</sup> The National Research Tomsk State University, TSU, 36 Lenin av., Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Надежда А. Булгакова. E-mail: bulgakovana@bk.ru

ORCID: Елена Е. Савельева – <https://orcid.org/0000-0002-6963-5851>; Надежда А. Булгакова – <https://orcid.org/0000-0002-3512-6573>; Екатерина З. Лапкина – <https://orcid.org/0000-0002-7226-9565>; Вита В. Черная – <https://orcid.org/0000-0002-1809-3773>; Владимир И. Курбатский – <https://orcid.org/0000-0002-8303-2045>.

Received: 30.11.2021

Revised: 01.09.2022

Published: 25.11.2022

© Савельева Е. Е., Булгакова Н. А., Лапкина Е. З., Черная В. В., Курбатский В. И., 2022  
© Savelyeva E. E., Bulgakova N. A., Lapkina E. Z., Chernaya V. V., Kurbatsky V. I., 2022

## Abstract

**Introduction.** The emerging resistance of bacteria to drugs is one of the serious problems of medicine, which stimulates the constant search for new antimicrobial drugs, also of natural origin. Researchers widely address representatives of various families and genus of the plant world, using various morphological groups of plant raw materials, studying the effect of both the sum of extracted substances and individual compounds.

**Aim.** Investigation of antimicrobial activity of water-alcohol extracts of some representatives of the genus *Potentilla* in the search for new antimicrobial medicines of plant origin.

**Materials and methods.** The objects of the study were extracts on 40 and 70 % ethyl alcohol from the aboveground part of *Potentilla anserina* L., *P. erecta* (L.) Raeusch, *P. argentea* L., *P. paradoxa* Nutt. ex Torr. et Gray, *P. goldbachii* Rupr., *P. approximate* Bunge, *P. chrysanthra* Trevir. Antimicrobial activity was determined by diffusion into agar using paper disks. Collection strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and 29 strains of MSSA isolated from biomaterial from patients were used as test cultures. The sensitivity of MSSA strains to antibiotics was characterized by an antibioticogram.

**Results and discussion.** The strain of *Escherichia coli* turned out to be insensitive to all extracts of the paws. The strain of *Pseudomonas aeruginosa* is minimally sensitive to extracts of 40 % ethyl alcohol of *P. anserina* and *P. argentea*, to 40 and 70 % extracts of *P. approximata*. All strains of *Staphylococcus aureus* (MSSA) are sensitive to all extracts of the paws to varying degrees. Among 40 % of the extracts, the most active are *P. anserina*, *P. paradoxa* and *P. erecta* extracts, among 70 % of the extracts are *P. paradoxa* and *P. argentea* extracts.

**Conclusion.** The studied extracts of seven *Potentilla* species showed antimicrobial activity against both sensitive and insensitive to antibiotic strains of *Staphylococcus aureus* (MSSA) to a close or comparable degree, while extracts on 40 % ethyl alcohol are slightly more active compared to extracts on 70 % ethyl alcohol. The results indicate that the studied *Potentilla* species are promising for further research.

**Keywords:** *Potentilla*, phenolic compounds, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*

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

**Contribution of the authors.** Elena E. Savelyeva developed the concept and design of the study, writing the text. Nadezhda A. Bulgakova performed the obtaining extracts, editing. Ekaterina Z. Lapkina carried out statistical data processing. Vita V. Chernaya carried out the planning and conducting the experiment, interpretation of the results. Vladimir I. Kurbatsky carried out the collection, identification and processing of plant raw materials.

**For citation:** Savelyeva E. E., Bulgakova N. A., Lapkina E. Z., Chernaya V. V., Kurbatsky V. I. Antimicrobial activity of water-alcoholic extracts of representatives of the genus *Potentilla* L. *Drug development & registration.* 2022;11(4):20–27. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-20-27>

## ВВЕДЕНИЕ

В медицинской практике для лечения инфекционных заболеваний, вызванных патогенными видами микроорганизмов, во многих случаях используют антибиотики и антибактериальные химиопрепараты. Но бактерии, вызывающие заболевания, со временем вырабатывают резистентность к применяемым препаратам [1]. Из этой проблемы вытекает существующий интерес к разработке новых антимикробных препаратов, в том числе природного происхождения. Антимикробная активность растительных экстрактов во многом связывается с содержанием в них различных групп полифенольных соединений [2–4], влияющих на проницаемость клеточных мембран и их целостность, а также ингибирующих синтез различных метаболитов и ДНК, образуя водородные связи с клеточными ферментами через ОН-группы [5–7]. Актуальными являются исследования антимикробной активности индивидуальных соединений, выделенных из растений, что дает нам представление о взаимосвязи структуры с действием фенольных соединений [8, 9].

Литературные источники свидетельствуют, что дубильные вещества, флавоноиды и другие фенольные соединения являются одними из основных групп

соединений, присутствующих в растениях различных видов рода *Potentilla* [10–12]. Растения этого рода издавна известны в народной медицине разных стран своими целебными свойствами и применяются для лечения различных заболеваний инфекционного и воспалительного характера. Отдельные виды рода *Potentilla* уже были рассмотрены на предмет выявления антимикробной активности [13–16].

**Цель данной работы** – исследование антимикробной активности водно-спиртовых экстрактов некоторых представителей рода *Potentilla* в рамках поиска новых антимикробных лекарственных средств растительного происхождения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали экстракти на 40%-м и 70%-м этиловом спирте (ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», г. Кемерово, Россия), полученные из надземной части *P. anserina*, *P. erecta*, *P. argentea*, *P. paradoxa*, *P. goldbachii*, *P. approximata*, *P. chrysanthra*. Надземную часть растений собирали в Томской области в окрестностях г. Томска летом 2020 года в период массового цветения, высушивали воздушно-теневым способом, измельчали до размера частиц, проходящих сквозь си-

то с диаметром отверстий 3 мм. Из измельченного сырья получали экстракты методом перколяции в соотношении сырье – экстрагент 1:1. Жидкий экстракт получали двумя порциями, первая порция составляла 85 % от массы сырья, после чего получали разбавленную вытяжку, которую концентрировали на роторном испарителе RE-52AA (Китай) при температуре 50 °C до 15 %, затем порции объединяли.

Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков [17, 18]. Исследования проводились на базе бактериологической лаборатории ФСНКЦ ФМБА (г. Красноярск). Бумажные диски (картон технический фильтровальный ГОСТ 6722-75, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург) диаметром 6 мм замачивали в экстракте на 24 часа, затем высушивали на воздухе для удаления экстрагента. В качестве тест-культур использовали коллекционные штаммы грамотрицательных факультативно-анаэробных бактерий *Escherichia coli* и аэробных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, грамположительного метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA) и 29 штаммов MSSA, выделенных из биоматериала пациентов ФСНКЦ ФМБА (г. Красноярск). Приготовление питательных сред, инокулюма из суточных агаровых культур, выполнение посевов и их инкубация проводились так же как при определении чувствительности к антибактериальным препаратам – в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04. Концентрация бактериальной взвеси составляла  $1.5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Инокулюм тест-штаммов микроорганизмов равномерно распределяли стерильным тампоном по поверхности питательной среды (агар Мюллера-Хинтона) в чашках Петри. В каждую чашку на засеянный слой агара помещали диски с экстрактами. Далее посевы инкубировали в термо-

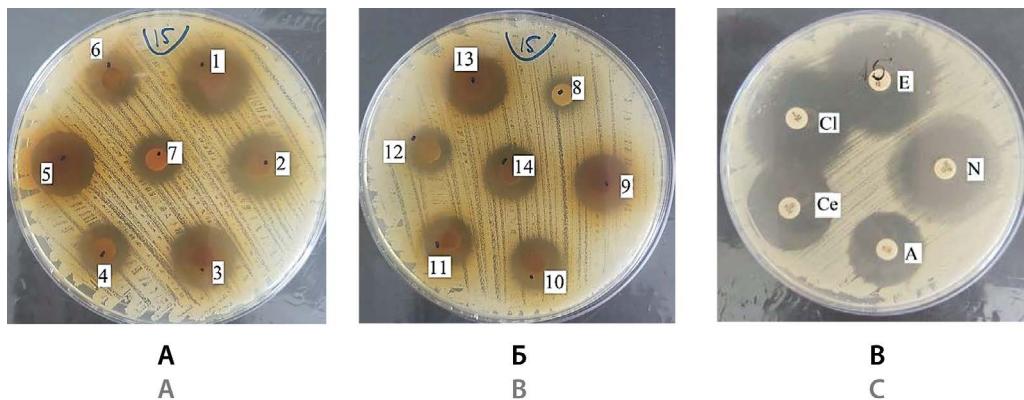
стате суховоздушном ТВ-80-1 (Россия) в течение 24 часов при температуре 35 °C.

Для оценки антибиотической активности исследуемых объектов проводили измерения видимой зоны задержки роста культуры бактерий с помощью линейки-лекала для измерения зоны антибиотикочувствительности (Индия). Отсутствие зоны задержки роста указывало на то, что культура бактерий нечувствительна к экстракту. Наличие зоны задержки роста культуры диаметром 10 мм и более указывало на чувствительность бактерий к испытуемым экстрактам, что принимали за антибиотический эффект. Определение антибиотической активности экстрактов проводили в трех повторностях. Для статистических расчетов использовали Microsoft Excel 2010. Данные в таблице представлены в виде среднеарифметического значения и стандартной ошибки ( $M \pm m$ ).

Для характеристики чувствительности к антибиотикам штаммов MSSA ставили антибиотикограммы с дисками антибиотиков цефокситина, амикацина, норфлоксацина, эритромицина, клиндамицина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инфекции нижних дыхательных и мочевыводящих путей, кровотока, мягких тканей, кожные инфекции часто вызываются бактериями *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Поэтому для определения антибиотической активности экстрактов лапчаток были взяты культуры этих бактерий. Определение антибиотической активности методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков позволяет исключить влияние экстрагента на бактерии и определить антибиотическую активность непосредственно экстрактивных веществ (рисунок 1).



**Рисунок 1.** Антибиотическая активность экстрактов некоторых видов *Potentilla* (А, В, цифровые обозначения экстрактов – в таблице 1) и антибиотикограмма в отношении штамма метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus*, выделенного из мазков со слизистой носа (С). Е – «Эритромицин» 15 мг; Н – «Норфлоксацин» 10 мг; А – «Амикацин» 30 мг; Се – «Цефокситин» 30 мг; Сl – «Клиндамицин» 2 мг

**Figure 1. Antimicrobial activity of extracts of some *Potentilla* species (A, B, the numerical designations of extracts are in table 1) and an antibioticogram against a strain of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from nasal mucosa smears (C). E – "Erythromycin" 15 mg; N – "Norfloxacin" 10 mg; A – "Amikacin" 30 mg; Ce – "Cefoxitin" 30 mg; Cl – "Clindamycin" 2 mg**

Активность исследуемых экстрактов в отношении штаммов рассматриваемых бактерий оказалась весьма различной. Штамм *Escherichia coli* оказался нечувствительным ко всем экстрактам лапчаток. Минимальную активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa* из всех экстрактов проявили экстракты на 40%-м этиловом спирте *P. anserina* и *P. argentea*, а также 40%-е и 70%-е экстракты *P. approximata*. Все экстракты лапчаток в различной степени проявили антимикробную активность в отношении штаммов MSSA.

Исследуемые штаммы MSSA были выделены из пяти групп биоматериала: 13 штаммов – из кала; 7 – из мазков со слизистой миндалин и задней стенки глотки; 3 – из мазков со слизистой носа; 3 – из раневого отделяемого; 3 – из другого биоматериала. Чувствительность к антибиотикам штаммов, выделенных из биоматериала, представлена на рисунке 2.

Все штаммы MSSA оказались чувствительны к цефокситину, амикацину, норфлоксации, при этом 6 штаммов были чувствительны в высоких дозах или нечувствительны к эритромицину и (или) клиндамицину. Один из штаммов, выделенный из мазка со слизистой миндалин и задней стенки глотки, проявил устойчивость к двум антибиотикам: клиндамицину и эритромицину, а также к действию всех исследуемых экстрактов лапчаток. Остальные 28 выделен-

ных штаммов и коллекционный штамм MSSA оказались чувствительными к экстрактам лапчаток. В таблице 1 представлены средние значения диаметров зоны задержки роста по группам выделения штаммов из биоматериала.

В зависимости от диаметра зоны задержки роста культуры экстракты по антимикробной активности можно разделить на 2 группы: при диаметре 10–12 мм – обладающие слабой антимикробной активностью, при диаметре более 12 мм – обладающие антимикробной активностью. К первой группе отнесли экстракты *P. goldbachii* и *P. chrysanthae*, ко второй – остальные экстракты.

Анализируя данные можно отметить, что 40%-е экстракты всех видов лапчаток проявили несколько большую активность в отношении штаммов, выделенных из мазков со слизистой миндалин и задней стенки глотки, и экстракты шести видов из семи – в отношении штаммов, выделенных из биоматериала кал. Экстракт *P. goldbachii* проявил достаточно слабую антимикробную активность. Экстракт *P. paradoxa* оказался более активен в отношении коллекционного штамма.

Среди 70%-х экстрактов лапчаток шесть экстрактов из семи более активны в отношении штаммов, выделенных из биоматериала кал (малоакти-

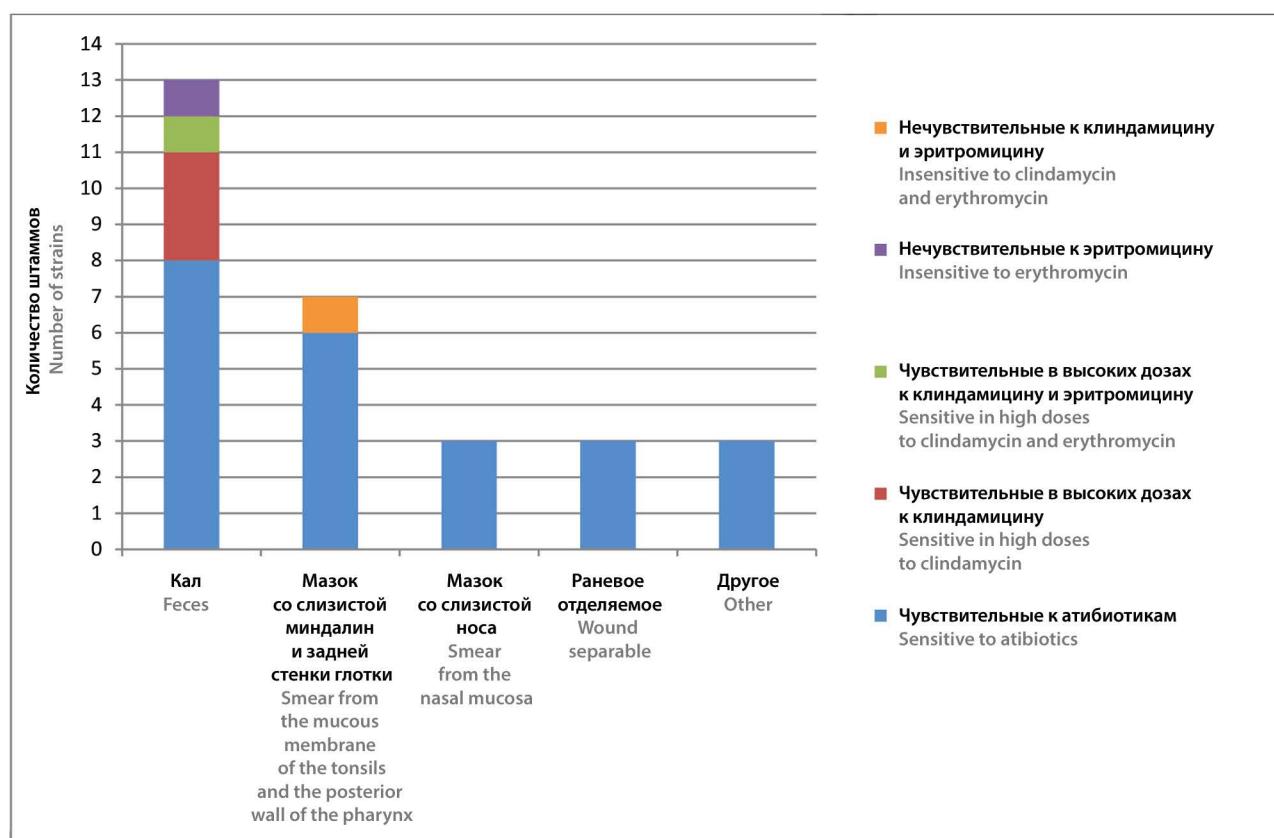


Рисунок 2. Чувствительность к антибиотикам штаммов, выделенных из различного биоматериала

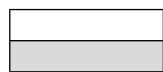
Figure 2. Antibiotic sensitivity of strains isolated from various biomaterials

**Таблица 1. Средние значения диаметров зоны задержки роста бактерий по группам выделения штаммов из биоматериала**

**Table 1. The average values of the diameters of the bacterial growth retardation zone by groups of isolation of strains from biomaterial**

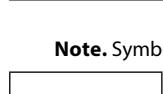
№	Экстракт Extract	Коллекционный штамм Collector's strain	Кал Feces	Мазок со слизистой миндалин и задней стенки глотки Smear from the mucous membrane of the tonsils and the posterior wall of the pharynx	Мазок со слизистой носа Smear from the nasal mucosa	Раневое отделяемое Wound separable
1	<i>P. paradoxa</i> <sup>40</sup>	17,5 ± 0,5	16,7 ± 1,5	17,0 ± 0,6	17,0 ± 0,3	15,2 ± 1,2
2	<i>P. paradoxa</i> <sup>70</sup>	16,5 ± 0,5	15,3 ± 1,4	15,5 ± 1,2	15,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0
3	<i>P. anserina</i> <sup>40</sup>	17,0 ± 0,0	17,2 ± 1,5	17,2 ± 0,9	17,5 ± 0,8	15,7 ± 0,7
4	<i>P. anserina</i> <sup>70</sup>	12,5 ± 1,5	14,2 ± 1,9	13,9 ± 1,1	13,0 ± 0,3	12,8 ± 0,8
5	<i>P. erecta</i> <sup>40</sup>	14,5 ± 0,5	16,9 ± 2,4	17,2 ± 0,9	16,0 ± 1,3	16,5 ± 0,5
6	<i>P. erecta</i> <sup>70</sup>	13,0 ± 0,0	13,6 ± 2,1	12,8 ± 1,4	12,2 ± 0,8	12,3 ± 0,8
7	<i>P. goldbachii</i> <sup>40</sup>	11,0 ± 1,5	12,1 ± 1,2	12,3 ± 1,1	12,0 ± 0,7	10,8 ± 0,8
8	<i>P. goldbachii</i> <sup>70</sup>	12,0 ± 0,0	12,1 ± 1,4	11,1 ± 1,1	10,7 ± 0,8	11,3 ± 1,3
9	<i>P. approximata</i> <sup>40</sup>	15,0 ± 0,0	15,9 ± 1,9	15,5 ± 1,2	15,0 ± 1,0	14,8 ± 1,2
10	<i>P. approximata</i> <sup>70</sup>	13,5 ± 0,5	14,0 ± 0,9	14,7 ± 0,6	14,3 ± 0,7	13,3 ± 0,8
11	<i>P. chrysanthia</i> <sup>40</sup>	12,0 ± 1,0	12,6 ± 1,3	12,1 ± 1,1	12,0 ± 1,0	10,3 ± 0,8
12	<i>P. chrysanthia</i> <sup>70</sup>	12,0 ± 1,0	12,8 ± 1,5	11,4 ± 0,9	11,5 ± 0,5	10,8 ± 0,8
13	<i>P. argentea</i> <sup>40</sup>	15,0 ± 0,0	15,7 ± 2,0	15,7 ± 1,1	16,0 ± 1,0	14,7 ± 0,8
14	<i>P. argentea</i> <sup>70</sup>	15,0 ± 0,0	15,3 ± 1,4	14,6 ± 0,8	14,7 ± 0,8	14,2 ± 1,2

**Примечание.** Условные обозначения: *P. paradoxa* 40 – экстракт на 40%-м этиловом спирте; *P. paradoxa* 70 – экстракт на 70%-м этиловом спирте.



Экстракты, обладающие антимикробной активностью

Extracts with antimicrobial activity



Экстракты, обладающие слабой антимикробной активностью

Extracts with weak antimicrobial activity

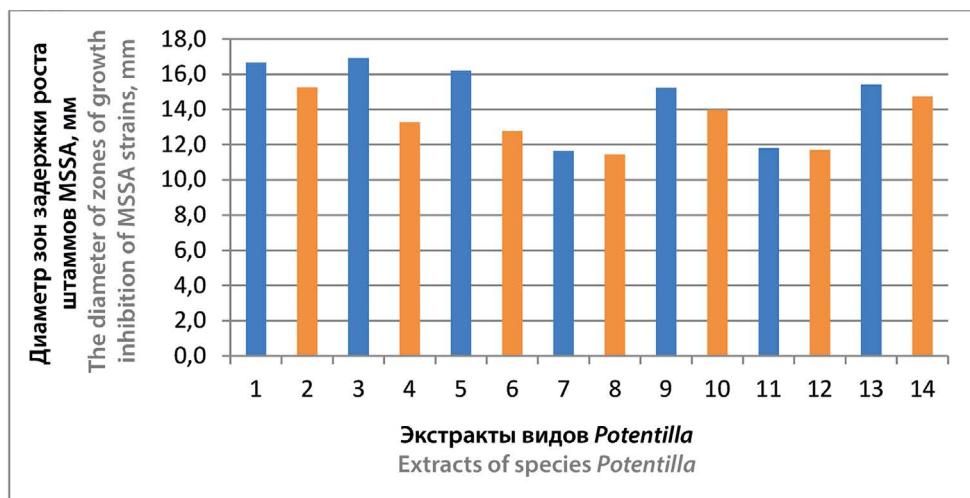
**Note.** Symbols: *P. paradoxa* 40 – extract on 40 % ethyl alcohol; *P. paradoxa* 70 – extract on 70 % ethyl alcohol.

вен экстракт *P. goldbachii*), и пять из них активны в отношении коллекционного штамма (малоактивны экстракты *P. goldbachii* и *P. chrysanthia*). Экстракт *P. approximata* больше воздействует на штамм, выделенный из мазков со слизистой миндалин и задней стенки глотки. Экстракт *P. anserina* на 70%-м этиловом спирте проявил невысокую антимикробную активность в отношении коллекционного штамма, а экстракт *P. goldbachii* показал свою минимальную активность в отношении штаммов, выделенных из мазков со слизистой носа.

Несколько менее активны все экстракты по отношению к штаммам из раневого отделяемого. В этом случае зоны задержки роста бактерий практически для каждого экстракта заметно меньше.

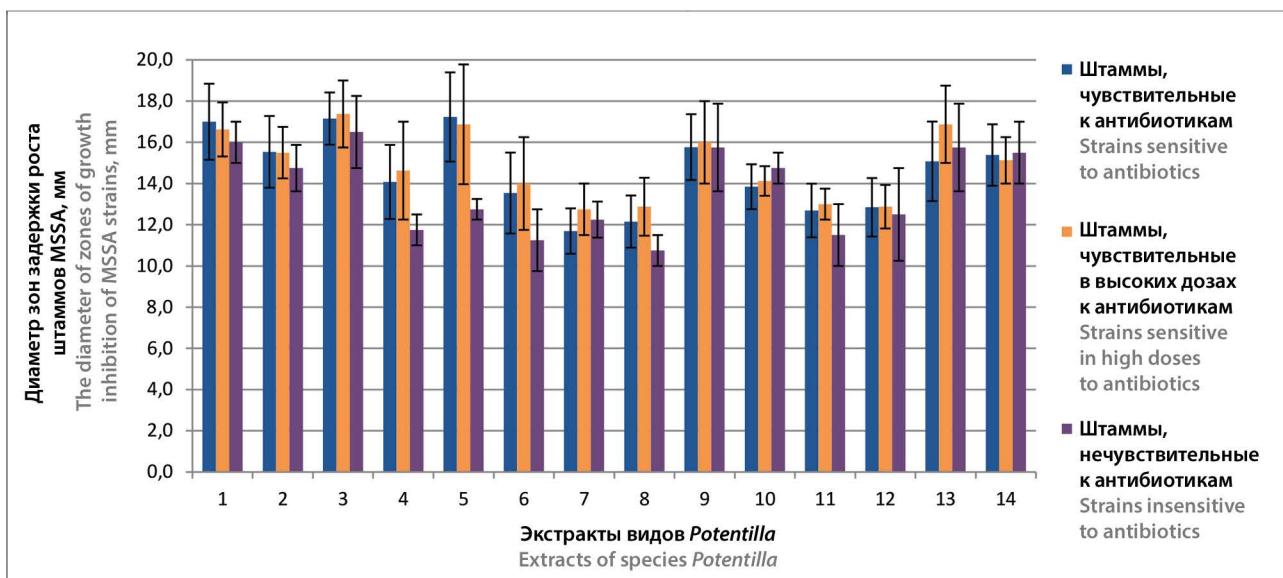
Известно, что выбор экстрагента для получения исследуемых экстрактов из растительного сырья во многом зависит от природы биологически активных веществ. Чаще всего максимальное количество биологически активных веществ с антимикробной активностью извлекают водно-спиртовые смеси [19, 20].

В случае экстрактов исследуемых видов *Potentilla* можно отметить, что экстракты, полученные на 40%-м



**Рисунок 3.** Среднее значение диаметра зон задержки роста штаммов метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus*, выделенных из различных биологических материалов (цифровые обозначения экстрактов – в таблице 1)

**Figure 3.** The average value of the diameter of growth retardation zones of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains isolated from various biological materials (the numerical designations of extracts are in table 1)



**Рисунок 4.** Среднее значение диаметра зон задержки роста штаммов метициллинчувствительного *Staphylococcus aureus* по-разному чувствительных к антибиотикам (биоматериал кал), цифровые обозначения экстрактов – в таблице 1

**Figure 4.** The average diameter of the growth retardation zones of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains are differently sensitive to antibiotics (fecal biomaterial), the numerical designations of extracts are in table 1

этанолом спирте, чаще проявляют более высокую антимикробную активность, чем экстракти, полученные на 70%-м этиловом спирте. На рисунке 3 представлено среднее значение диаметров задержки роста *Staphylococcus aureus*, выделенных из различных биологических материалов, для экстрактов лапчаток на 40%-м и 70%-м этиловом спирте.

Наиболее высокую антимикробную активность в отношении всех штаммов среди экстрактов на 40%-м этиловом спирте проявили экстракти *P. anserina*, *P. pa-*

*radoxa* и *P. erecta*, в несколько меньшей степени активны экстракти *P. approximata* и *P. chrysanthia*.

Среди экстрактов на 70%-м этиловом спирте наиболее активны экстракти *P. paradoxa* и *P. argentea*, далее – экстракти *P. approximata*, *P. anserina* и *P. erecta*.

Наименьшую и близкую по величине активность в отношении всех штаммов продемонстрировали как 40%-е, так и 70%-е экстракти родственных видов из секции *Chrysanthae* Th. Wolf – *P. goldbachii* и

*P. chrysanthia* (средние значения диаметров зон задержки роста штаммов около 12 мм).

Коллекционный штамм MSSA и 28 выделенных штаммов MSSA в близкой или весьма сравнимой степени реагируют на исследуемые экстракты лапчаток (рисунок 4). Этот факт позволяет и далее рассматривать изучаемые виды растений как перспективные для дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракты, приготовленные на 40%-м и 70%-м этиловом спирте из надземной части *P. paradoxa*, *P. anserina*, *P. erecta*, *P. approximata*, *P. argentea*, *P. goldbachii*, *P. chrysanthia*, проявляют антимикробную активность по отношению ко всем рассмотренным штаммам MSSA.

Наибольшую антимикробную активность по отношению к штаммам MSSA проявляют экстракты *P. paradoxa*, *P. anserina*, *P. erecta*, *P. approximata*, *P. argentea*, а наименьшую – экстракты двух родственных видов: *P. goldbachii* и *P. chrysanthia*.

Экстракты лапчаток на 40%-м этиловом спирте более активны по сравнению с экстрактами на 70%-м этиловом спирте, что, вероятно, связано с более высоким содержанием дубильных веществ в экстрактах на 40%-м этаноле, накопление которых характерно для растений рода *Potentilla*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T*. 2015;40(4):277–283.
2. Barreca D., Gattuso G., Bellocchio E., Calderaro A., Trombetta D., Smeriglio A., Lagana G., Daglia M., Meneghini S., Nabavi S. M. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors*. 2017;43(4):495–506. DOI: 10.1002/biof.1363.
3. Alvarez-Martínez F. J., Barrajón-Catalán E. J., Encinar A., Rodríguez-Díaz J. C., Micol V. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Curr. Med. Chem.* 2020;27(15):2576–2606. DOI: 10.2174/0929867325666181008115650.
4. Nasir B., Fatima H., Ahmad M., Haq I. U. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J. Microbiol.* 2015;1(1):1002.
5. Chibane L. B., Degraeve P., Ferhout H., Bouajila J., Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J. Sci. Food. Agric.* 2019;99:1457–1474. DOI: 10.1002/jsfa.9357.
6. Khameneh B., Iranshahy M., Soheili V., Bazzaz B. S. F. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. In.* 2019;8(118). DOI: 10.1186/s13756-019-0559-6.
7. Буданова Е. В., Горленко К. Л., Киселев Г. Ю. Вторичные метаболиты растений: механизмы антибактериального действия и перспективы применения в фармакологии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019;64(5-6):69–76. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100034.
8. Caturla N., Vera-Samper E., Villalain J., Mateo C. R., Micol V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Bio. Med.* 2003;34(6):648–662. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01366-7.
9. Sato Y., Suzaki S., Nishikawa T., Kihara M., Shibata H., Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 2000;72(3):483–488. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00265-8.

10. Триль В. М. Сравнительный анализ фенольных веществ рода *Potentilla* L. Юго-Восточного Алтая. В кн.: Растительные ресурсы Южной Сибири и пути их освоения. Новосибирск: Наука; 1977. 33–45 с.
11. Augustynowicz D., Latte K. P., Tomczyk M. Recent phytochemical and pharmacological advances in the genus *Potentilla* L. sensu lato – An update covering the period from 2009 to 2020. *J. Ethnopharmacol.* 2021;122(2):184–204. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113412.
12. Olennikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Kuz'mina S. S. Phenolic Profile of *Potentilla anserina* L. (Rosaceae) Herb of Siberian Origin and Development of a Rapid Method for Simultaneous Determination of Major Phenolics in *P. anserina* Pharmaceutical Products by Micro-column RP-HPLC-UV. *Molecules*. 2015;20(1):224–248. DOI: 10.3390/molecules20010224.
13. Tomovic M., Popovic-Milenkovic M., Jankovic S. Antimicrobial Activity of Aqueous Extracts of *Potentilla Reptans* L. Rhizome and Aerial Part. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 2018;19(4):321–324. DOI: 10.1515/sjerc-2017-0041.
14. Хисякова Д. М., Куркин В. А., Лямин А. В., Жестков А. В. Антимикробная активность водных извлечений из подземных органов некоторых видов лапчатки. *Фармация*. 2016;63(1):32–34.
15. Хисякова Д. М., Куркин В. А., Жестков А. В., Лямин А. В. Сравнение антимикробной активности настоек, полученных из подземных органов представителей рода *Potentilla* L. *Медицинский альманах*. 2016;4(44):151–153.
16. Tomczyk M., Leszczynska K., Jakoniuk P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia*. 2008;79(7–8):592–594. DOI: 10.1016/j.fitote.2008.06.006.
17. Mith H., Dure R., Delcenserie V., Zhiri A., Daube G., Clinquart A. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci. Nutr.* 2014;2(4):403–416. DOI: 10.1002/fsn3.116.
18. Kara M., Assouguem A., Kamaly O. M. A., Benmessaoud S., Imtara H., Mechchate H., Hano C., Zerhouni A. R., Bahhou J. The Impact of Apple Variety and the Production Methods on the Antibacterial Activity of Vinegar Samples. *Molecules*. 2021;26:5437. DOI: 10.3390/molecules26185437.
19. Parekh J., Jadeja D., Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk. J. Biol.* 2005;29:203–210.
20. Lu Y., Joerger R., Wu C. Study of the Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Ethanolic Extracts from Roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J. Agric. Food Chem.* 2011;59(20):10934–10942. DOI: 10.1021/jf202741x.

## REFERENCES

1. Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T*. 2015;40(4):277–283.
2. Barreca D., Gattuso G., Bellocchio E., Calderaro A., Trombetta D., Smeriglio A., Lagana G., Daglia M., Meneghini S., Nabavi S. M. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors*. 2017;43(4):495–506. DOI: 10.1002/biof.1363.
3. Alvarez-Martínez F. J., Barrajón-Catalán E. J., Encinar A., Rodríguez-Díaz J. C., Micol V. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Curr. Med. Chem.* 2020;27(15):2576–2606. DOI: 10.2174/0929867325666181008115650.
4. Nasir B., Fatima H., Ahmad M., Haq I. U. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J. Microbiol.* 2015;1(1):1002.
5. Chibane L. B., Degraeve P., Ferhout H., Bouajila J., Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J. Sci. Food. Agric.* 2019;99:1457–1474. DOI: 10.1002/jsfa.9357.

6. Khameneh B., Iranshahy M., Soheili V., Bazzaz B. S. F. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. In.* 2019;8(118). DOI: 10.1186/s13756-019-0559-6.
7. Budanova E. V., Gorlenko K. L., Kiselev G. Yu. Secondary Plant Metabolites: Mechanisms of Antibacterial Action and Perspectives of Application in Pharmacology. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2019;64(5-6):69–76. (In Russ.) DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100034.
8. Caturla N., Vera-Samper E., Villalain J., Mateo C. R., Micó V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Bio. Med.* 2003;34(6):648–662. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01366-7.
9. Sato Y., Suzaki S., Nishikawa T., Kihara M., Shibata H., Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 2000;72(3):483–488. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00265-8.
10. Tril' V. M. Comparative analysis of phenolic substances of the genus *Potentilla* L. of the Southeastern Altai. In: Plant resources of Southern Siberia and ways of their development. Novosibirsk: Nauka; 1977. 33–45 p. (In Russ.)
11. Augustynowicz D., Latte K. P., Tomczyk M. Recent phytochemical and pharmacological advances in the genus *Potentilla* L. sensu lato – An update covering the period from 2009 to 2020. *J. Ethnopharmacol.* 2021;122(2):184–204. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113412.
12. Olenikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Kuz'mina S. S. Phenolic Profile of *Potentilla anserina* L. (Rosaceae) Herb of Siberian Origin and Development of a Rapid Method for Simultaneous Determination of Major Phenolics in *P. anserina* Pharmaceutical Products by Micro-column RP-HPLC-UV. *Molecules.* 2015;20(1):224–248. DOI: 10.3390/molecules20010224.
13. Tomovic M., Popovic-Milenkovic M., Jankovic S. Antimicrobial Activity of Aqueous Extracts of *Potentilla Reptans* L. Rhizome and Aerial Part. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 2018;19(4):321–324. DOI: 10.1515/sjerc-2017-0041.
14. Khisyamova D. M., Kurkin V. A., Lyamin A. V., Zhestkov A. V. Antimicrobial activity of water extracts from underground organs of some types of *Potentilla*. *Pharmacy.* 2016;63(1):32–34. (In Russ.)
15. Khisyamova D. M., Kurkin V. A., Zhestkov A. V., Lyamin A. V. Comparison of antimicrobial activity of spirit liqueurs obtained out of underground parts of species *Potentilla* L. *Medical Almanac.* 2016;4(44):151–153. (In Russ.)
16. Tomczyk M., Leszczynska K., Jakoniuk P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia.* 2008;79(7–8):592–594. DOI: 10.1016/j.fitote.2008.06.006.
17. Mith H., Dure R., Delcenserie V., Zhiri A., Daube G., Clinquart A. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci. Nutr.* 2014;2(4):403–416. DOI: 10.1002/fsn3.116.
18. Kara M., Assouguem A., Kamaly O. M. A., Benmessaoud S., Imtara H., Mechchate H., Hano C., Zerhouni A. R., Bahhou J. The Impact of Apple Variety and the Production Methods on the Antibacterial Activity of Vinegar Samples. *Molecules.* 2021;26:5437. DOI: 10.3390/molecules26185437.
19. Parekh J., Jadeja D., Chanda S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk. J. Biol.* 2005;29:203–210.
20. Lu Y., Joerger R., Wu C. Study of the Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Ethanolic Extracts from Roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J. Agric. Food Chem.* 2011;59(20):10934–10942. DOI: 10.1021/jf202741x.



Обзорная статья / Review article

## Дереза: перспективы применения в фармации растительного сырья, содержащего алкалоиды, флавоноиды, полисахариды и другие биологически активные вещества растения семейства пасленовых (*Solanaceae*) (обзор)

Б. Тупа<sup>1</sup>, О. Г. Потанина<sup>2</sup>, Е. В. Успенская<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ Контактное лицо: Успенская Елена Валерьевна. E-mail: uspenskaya75@mail.ru

ORCID: Б. Тупа – <https://orcid.org/0000-0003-0291-6285>; О. Г. Потанина – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Е. В. Успенская – <https://orcid.org/0000-0003-2147-8348>.

Статья поступила: 30.11.2021

Статья принята в печать: 02.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Обзор посвящен научному анализу состава, свойств и особенностей биологического воздействия на организм человека плодов дерезы, как перспективного растительного сырья для производства новых лекарственных средств.

**Текст.** Рассмотрены важнейшие аспекты, связанные с растительным сырьем различных видов дерезы, такие как мировая распространенность растений и унификация многочисленных синонимичных названий сырья, обобщение фармакопейных данных, качественный и количественный состав компонентов *Lycium*, их структурные особенности, биологические эффекты на жизненно важные системы организма. В обзоре представлена проблема отсутствия в стандартах РФ монографий на сырье растений дерезы, несмотря на существующий и процветающий на территории РФ растения дерезы русской (*Lycium ruthenicum* Murray). Этот факт открывает значительные возможности разработки нормативной документации в ГФ РФ на сырье дерезы, в том числе дерезы русской как перспективного ЛРС.

**Заключение.** Полученные результаты демонстрируют потенциальную возможность введения в фармацию нового вида лекарственного растительного сырья и готовых лекарственных препаратов на их основе, а также прогнозировать биологическую активность веществ плодов дерезы и механизмы действия алкалоидов, флавоноидов, полисахаридов и каротиноидов *Lycium*.

**Ключевые слова:** сырье дерезы обыкновенной, дерезы китайской и дерезы русской, полисахариды *Lycium barbarum* (LBPs), антиоксидантная активность

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

**Вклад авторов.** Б. Тупа, О. Г. Потанина авторы идеи, осуществляли сбор и анализ литературных данных. Б. Тупа выполнила сбор и анализ литературных данных. Б. Тупа, Е. В. Успенская подготовили обзор по разновидностям и механизмам действия БАВ дерезы.

**Для цитирования:** Тупа Б., Потанина О. Г., Успенская Е. В. Дереза: перспективы применения в фармации растительного сырья, содержащего алкалоиды, флавоноиды, полисахариды и другие биологически активные вещества растения семейства пасленовых (*Solanaceae*). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):28–39. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-28-39>.

## ***Lycium: Prospects of Application in Pharmacy of Plant Raw Materials Containing Alkaloids, Flavonoids, Polysaccharides and Other Biologically Active Substances of the Solanaceae Family Plants (Review)***

Bleona Tupa<sup>1</sup>, Olga G. Potanina<sup>2</sup>, Elena V. Uspenskaya<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

✉ Corresponding author: Elena. V. Uspenskaya. E-mail: uspenskaya75@mail.ru

ORCID: Bleona Tupa – <https://orcid.org/0000-0003-0291-6285>; Olga G. Potanina – <https://orcid.org/0000-0002-0284-419X>; Elena V. Uspenskaya – <https://orcid.org/0000-0003-2147-8348>.

Received: 30.11.2021      Revised: 02.09.2022      Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** The review is dedicated to the scientific analysis of the composition, properties and features of the biological effects on the man's organism of the *Lycium Fruit* as a prospective plant raw material for the production of innovative drugs.

**Text.** The most important aspects related to plant raw materials of various types of *Lycium* are considered, such as, the worldwide prevalence of plants and the unification of raw materials numerous synonymous names, the generalization of pharmacopoeia data, the qualitative and quantitative composition of *Lycium* components, their structural features, biological effects on vital body systems. The review also presents the problem of the absence of general pharmacopoeia monographs on *Lycium* raw materials in Russia, despite the cultivation of *Lyceum ruthenicum* M.

plants in Russia. This fact opens up significant opportunities to develop the Russian regulatory document for *Lycium*, as a promising pharmaceutical raw material.

**Conclusion.** The obtained results demonstrate the potential of introducing into pharmacy a new type of pharmaceutical raw material and a new finished products based on them, as well as predicting the biological activity of the substances of *Lycium fruit* and mechanisms of alkaloids, flavonoids, polysaccharides and *Lycium carotenoids* action.

**Keywords:** pharmaceutical raw material of *Lycium barbarum*, *Lycium chinense* and *Lycium ruthenicum*, *Lycium barbarum* polysaccharides (LBPs), antioxidant activity

**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.** Bleona Tupa, Olga G. Potanina the authors of the idea, collection and analysis of literary data. Bleona Tupa performed the collection and analysis of literary data. Bleona Tupa, Elena V. Uspenskaya prepared a review on the varieties and mechanisms of action of *Lycium* components.

**For citation:** Tupa B., Potanina O. G., Uspenskaya E. V. Lycium: prospects of application in pharmacy of plant raw materials containing alkaloids, flavonoids, polysaccharides and other biologically active substances of the Solanaceae family plants. *Drug development & registration*. 2022;11(4):28–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-28-39>

## ВЕДЕНИЕ

Научный интерес к дерезе или *Lycium barbarum* L. был проявлен в середине XX века и был связан не только с накопленными данными, свидетельствующими о биологических эффектах данного растения, но и инструментальными возможностями изолирования и анализа активных веществ [1].

Примером служит научное заявление исследователей из Пакистана в 1969 г. о гипотензивном действии бербамина – алкалоида *Lycium barbarum* L., механизма которого заключался в прямом угнетающем действии на миокард в дозе от 0,125 мг до 1 мг и высвобождении гистамина из тканей подопытных животных [2]. В 1968 г. японскими исследователями из Школы медицины университета Токио было установлено, что введение внутривенной инъекции неочищенного экстракта *Lycium chinense* M. способствовало овуляции у взрослой самки кролика. Это дало начало исследованиям в репродуктивной физиологии животных по оценке влияния плодов *Lycium* на гормональный профиль, продуктивность и репродуктивную функцию самок кроликов [3].

Растения рода *Lycium* широко используется в традиционной китайской медицине, а также приобрели широкое мировое признание в качестве компонента питания. Опрос среди 106 фитотерапевтов Израиля об использовании пасленовых в качестве лекарственных растений показал, что только четыре вида, среди которых встречается и дереза – *Lycium europeum*, *Solanum nigrum*, *Hyoscyamus aureus*, *Hyoscyamus albus*, – широко используются в настоящее время [4]. Наглядным примером, свидетельствующим об эффективном и распространенном

применении *Lycium* в медицине, является состав традиционного китайского медицинского экстракта (Traditional Chinese Medicine Plant Extract, TCME) для лечения алкоголь-зависимой остеопении, включающего ЛРС: *Lycium barbarum*, *Astragalus*, *Cistanche deserticola*, *Dioscorea polystachya*, *Epimedium*, *Cinnamomum cassia*, *Syzygium aromaticum*, *Angelica sinensis*, and *Curculigo orchioides* [5].

История упоминания дерезы (*Lycium*) датируется 2070 г. до н. э. в виде костяных скриптов в китайских династиях Ся и Шан бассейна реки Хуанхэ [6]. В китайском языке плоды дерезы называются «гou qí zi», где «gou» означает «собака/волк», а «zi» – «маленький фрукт/ягода». В литературе встречаются многочисленные альтернативные (претенциозные) названия дерезы: лиций, волчья ягода (wolfberry), ягода годжи (goji berry), чайное растение герцога Аргайлла (Duke of Argyll's tea plant), тибетский барбарис (Tibetan barberry), чертовы плети, ткенна белолозая. Однако во избежание ошибок при описании растительного сырья дерезы следует придерживаться ботанических научных названий растений: дереза обыкновенная (*Lycium barbarum* L.), дереза китайская (*Lycium chinense* Mill.), дереза арабская (*Lycium arabicum* Schweinf. ex Boiss.), дереза европейская (*Lycium europaeum* Miers), дереза русская (*Lycium ruthenicum* Murray) и др., соответствующие естественному ареалу их произрастания [7]. Все разновидности дерезы относятся к таксономическим категориям: отдел – цветковые; класс – двудольные; семейство – пасленовые (*Solanaceae*); триба – *Lycieae*; род – дереза; включают более 90 видов, семь из которых встречаются в Китае [8].

Дереза обыкновенная – многолетний листопадный ветвистый кустарник 1–2,5 м высотой с длинными, тонкими светло-желтыми побегами и неолистовыми пазушными колючками 6–15 мм. Плод – красная продолговато-яйцевидная или острия ягода, 8–18 мм длиной. Ягоды собирают спелыми, сушат до состояния сморщенного околоплодника и подвергают воздействию прямого солнечного света до тех пор, пока экзокарпий станет сухим и твердым, а мякоть – мягкой [9]. Долгое время в качестве компонентов пищи использовались плоды, листья, кора, корни и молодые побеги *Lycium*. Позднее для извлечения биологически активных веществ использовали плоды – ягоды и корни. Согласно [10] из 97 только 35 видов *Lycium* зарегистрированы в мире для применения в диетологии и медицине (рисунок 1).

В то время как 85 % видов *Lycium* встречаются в Америке и Африке, из них используются только 26 %, из четырнадцати – только 9 видов в Евразии, два – *L. barbarum* и *L. chinense* – в Китае и в РФ (*L. barbarum* L. и *Lycium ruthenicum* M). Несмотря на то, что плоды *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* были внесены в государственные фармакопеи разных государств (см. рисунок 1, Ж), спецификации и требования к качеству в нормативных документах различаются.

**Цель настоящего обзора** – обобщение научных данных и сведений по составу, свойствам, методам испытаний и биологическим эффектам плодов *Lycium*.

## ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАНДАРТЫ

19 марта 2019 года некоммерческая образовательная организация (НОО) «Американская фармакопея трав» (American Herbal Pharmacopoeia, AHP) выпустила монографию на плоды дерезы (*Lycium barbarum*, *L. chinense*, Solanaceae). Описанная монография *Lycium* стала тридцать девятым выпуском, опубликованным некоммерческой образовательной организацией «Американская фармакопея трав» с 1998 года, и включала в себя результаты объединенной работы с Институтом развития лекарственных растений Китайской академии медицинских наук и 32 экспертов из академических кругов, промышленности и медицинской практики<sup>1</sup>.

По состоянию на 2021 год нормативные документы на ЛРС растений *Lycium barbarum* L. и *Lycium chinense* Mill. представлены в фармакопеях Китая, Кореи, Японии, Великобритании и, как правило, вклю-

<sup>1</sup> Monograph AHP – *Lycium* (Goji) Fruit. The website of the American Herbal Pharmacopoeia. Available at: <https://herbal-ahp.com/collections/frontpage/products/lycium-goji-berry>. Accessed: 21.03.2022.

чают разделы: название и описание, подлинность, чистота, количественное определение (таблица 1)<sup>2,3,4,5,6</sup>.

Таким образом, сравнительный анализ фармакопейных требований к ЛРС *Lycium* демонстрирует существующие различия в видах анализируемого сырья и перечне показателей качества, следовательно, необходимость гармонизации фармакопей на данный вид сырья в условиях глобализации их обращения.

## Обзор химических компонентов рода *Lycium* (Solanaceae)

Согласно [11, 12], в различных видах растительного сырья *Lycium* и частях растений (плоды, корневая кора, листья, семена и цветы) обнаружено около 355 компонентов, которые классифицированы на группы: глицерогалактолипиды (около 17 соединений), фенилпропаноиды (4 соединения), кумарины (9 соединений), лигнаны (8 соединений), флавоноиды (27 соединений), амиды (около 16 соединений), алкалоиды (около 72 веществ групп имидазола, пиперицина, пиррола, спермина, тропана), антрахионы (4 соединения), органические кислоты (32 вещества), терпеноиды (около 37 структур), стерины и стероиды (57 соединений), пептиды (5 соединений) и другие составляющие. Соотношение различных соединений в сырье дерезы и химические структуры некоторых соединений представлены на рисунке 2 и в таблице 2.

Растительное сырье дерезы содержит также полисахариды (*L. barbarum* Polysaccharide, LBPs), которые, по мнению некоторых исследований, являются основными биологически активными компонентами дерезы и составляют от 5 до 8 % по содержанию в высушенных плодах [26]. Из плодов *L. barbarum*, *L. chinense* и *L. ruthenicum* были выделены более 40 полисахаридов с диапазоном молекулярной массы 8–241 кДа. Полисахариды имеют общую гли-

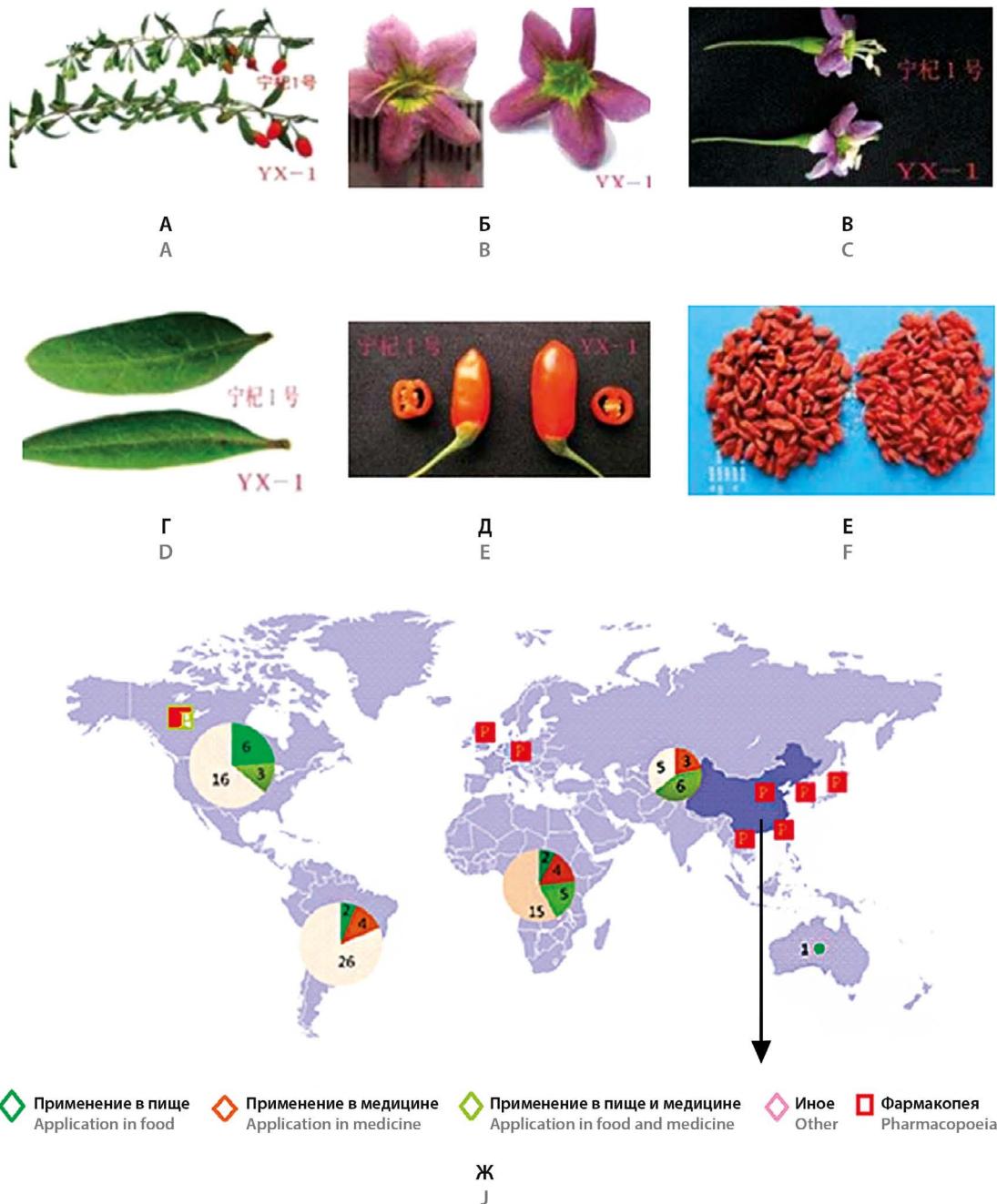
<sup>2</sup> Monograph JP XVII – *Lycium* Fruit. The website of the Japanese Pharmacopoeia 17th Edition. Available at: <https://www.pmda.go.jp/english/rs-sb-std/standards-development/jp/0019.html>. Accessed: 21.03.2022.

<sup>3</sup> Monograph Korean Pharmacopoeia (Tenth Edition) – *Lycium* Fruit. The website of the Korean Pharmacopoeia (Tenth Edition). Available at: [https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m\\_18/view.do?seq=70483&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=1](https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_18/view.do?seq=70483&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1). Accessed: 21.03.2022.

<sup>4</sup> Monograph Taiwan Herbal Pharmacopoeia 2nd Edition – Wolfberry, *Lycii* Fructus. The website of the Korean Pharmacopoeia (Tenth Edition). Available at: <https://www.mohw.gov.tw/cp-3690-39025-2.html>. Accessed: 21.03.2022.

<sup>5</sup> Chinese Pharmacopoeia, 2015 (English Edition). Volume 1. *Lycium barbarum* L. Available at: <https://www.usp.org/products/chinese-pharmacopoeia>. Accessed: 21.03.2022.

<sup>6</sup> British Pharmacopoeia, 2019, *Lycium barbarum* Linné. Available at: <https://www.pharmacopoeia.com/BP2019>. Accessed: 21.03.2022.



**Рисунок 1. Ботаническая идентификация *L. barbarum*:**

**А – ветви с ягодами; Б и В – цветки; Г – листья; Д – свежие плоды (ягоды); Е – высушенные плоды; Ж – мировое распространение *Lycium* и преимущественные виды применения растительного сырья [10]**

**Figure 1. Botanical identification of *L. barbarum*:**

**A – branches with berries; B and C – flowers; D – leaves; E – fresh fruits (berries); F – dried fruits; J – the worldwide distribution of *Lycium* and the primary uses of plant raw materials [10]**

копептидную структуру гликан-О-Сер и содержат галактуроновую кислоту, 18 аминокислот и 9 моносахаридов, а именно ксилозу (Xyl), глюкозу (Glc), арабинозу (Ara), рамнозу (Rha), маннозу (Man), галактозу (Gal), фукоиданы (Fuc), галактуроновую (GalA) и глюкуроновую кислоту (GlcA) [27]. Молярные соотношения некоторых полисахаридов и воз-

можная структура повторяющихся звеньев приведены в таблице 3.

Исследования [29] показали, что моносахаридные и аминокислотные остатки представляют собой гликоконъюгаты. Согласно анализу гликозидных связей участки разветвления и боковые цепи рассматривались как структура полисахаридов *L. barbarum* [30].

**Таблица 1. Сравнительные фармакопейные требования к контролю качества лекарственного сырья *Lycium***

**Table 1. Comparative pharmacopoeia requirements for quality control of pharmaceutical raw material *Lycium***

Растение, Название, Синонимы Plant, Names, Synonyms	Описание Description	Показатели качества Parameter of quality		Количественное определение Assay
		Подлинность Identification	Чистота Purity	
<i>Китайская фармакопея</i> <i>The Pharmacopoeia of the People's Republic of China, English Edition 2000/2005</i>				
<i>Fructus Lycii Gouqizi</i> Плоды <i>Lycium barbarum</i> L.	Плоды подгнуто-рыбковидной или эллипсоидной формы длиной 6–20 мм, $d = 3–8$ мм, яного или темно-красного цвета; без запаха, вкус сладкий Fruits are subbubbles-shaped or ellipsoid, 6–20 mm long, $d = 3–8$ mm, scarlet or dark red; odorless, sweet taste	TCX – фиолетовые зоны между $R_f \approx 0.71$ и $R_f \approx 0.89$ (каротиниды), синяя зона при $R_f \approx 0.56$ (зеаксантин), розово-фиолетовые зоны при $R_f \approx 0.42$ (эфиорное масло), синяя флуоресцентная зона при $R_f \approx 0.81$ (скополетин), фиолетовая зона между $R_f \approx 0.52$ –0.57 (индолевая кислота) TLC – violet zones between $R_f \approx 0.71$ and $R_f \approx 0.89$ (carotenoids), blue zone at $R_f \approx 0.56$ (zeaxanthin), pink-violet zones at $R_f \approx 0.42$ (essential oil), blue fluorescent zone at $R_f \approx 0.81$ (scopolatin), violet zone between $R_f \approx 0.52$ –0.57 (linoleic acid)	–	ВЭЖХ (содержание суммы полисахаридов не менее 1,8 %) HPLC (content of total polysaccharides not less than 1.8 %)
<i>Британская фармакопея</i> <i>The British Pharmacopoeia (BP) 2019/Barberry Wolfberry Fruit</i>				
<i>Barberry Wolfberry fruit.</i> Сушеные, цельные, спелые плоды <i>Lycium barbarum</i> L.	Эллиптическая, веретенообразная или яйцевидная форма длиной 6–20 мм, $d = 3–10$ мм, оранжево-красного или темно-красного цвета Elliptical, fusiform or ovoid, 6–20 mm long, $d = 3–10$ mm, orange-red or dark red	1. Морфологические особенности. 2. Микроскопические характеристики. 3. TCX – ярко-синее флуоресцентное пятно для скополетина, оранжевое флуоресцентное пятно для рутозида 1. Morphological features. 2. Microscopic. 3. TLC – bright blue fluorescent spot for scopoletin, orange fluorescent spot for rutoside	1. Потеря при высушивании (не более 11 %, 2 ч). 2. Общая зона ( $\leq 5$ %) 1. Loss on drying (no more than 11%, 2 hours). 2. Total ash ( $\leq 5$ %)	Экстрактивные вещества* ( $\geq 55,0$ %) Extractives* ( $\geq 55,0$ %)
<i>Фармакопея Японии</i> <i>The Japanese Pharmacopoeia (JP) XVII/Crude Drugs and Related Drugs / Lycium Fruit</i>				
<i>Lycium fruit.</i> Плоды <i>Lycium</i> – это плоды растения <i>Lycium chinense</i> или <i>Lycium barbarum</i> Linne	Веретенообразный плод с острой вершиной длиной 6–20 мм, $d = 3–8$ мм, темно-красного цвета. Запах характерный вкус сладкий, слегка горьковатый Fusiform fruit with a sharp apex, 6–20 mm long, $d = 3–8$ mm, dark red. Odor characteristic taste sweet, slightly bitter	TCX – желтое основное пятно появляется при значении $R_f$ около 0,6 TLC – a yellow main spot appears at an $R_f$ value of about 0.6	1. Посторонние примеси ( $\leq 2$ %). 2. Общая зона ( $\leq 8$ %). 3. Кислота нерастворимая зола ( $\leq 1$ %) 1. Foreign impurities ( $\leq 2$ %). 2. Total ash ( $\leq 8$ %). 3. Acid insoluble ash ( $\leq 1$ %)	Экстрактивные вещества* ( $\leq 35,0$ %) Extractives* ( $\leq 35,0$ %)

Растение, Название, Синонимы Plant, Names, Synonyms	Показатели качества Parameter of quality			
	Описание Description	Подлинность Identification	Чистота Purity	Количественное определение Assay
<p><i>Lycium fruit (Lycii fructus).</i></p> <p>Плоды <i>Lycium</i> – ярко-оранжево-красные ягоды эллипсовоидной формы длиной 1–2 см и <math>d = 3–8</math> мм</p> <p>The fruits are bright orange-red ellipsoid-shaped berries 1–2 cm long and <math>d = 3–8</math> mm</p>	<p><i>Korejskaya farmakopeia traud</i> The Korean Herbal Pharmacopoeia</p> <p>Плод <i>Lycium</i> – эллиптический длиной от 6 до 20 мм и <math>d = 3–10</math> мм, темно-красного цвета, обладают легким характерным запахом и сладким вкусом</p> <p>The fruit of <i>Lycium</i> is elliptical, from 6 mm to 20 mm long and <math>d = 3–10</math> mm; dark red; have a slight characteristic odor and sweet taste</p>	<p><math>R_f \approx 0,6</math></p> <p>TLC – одно желтоватое пятно при значении <math>R_f \approx 0,6</math></p>	<p>1. Посторонние вещества – &lt;3,0 % ветвей и плодоножек.</p> <p>2. Тяжелые Me: Pb (<math>\leq 5</math> ppm); As (<math>\leq 3</math> ppm); Hg (<math>\leq 0,2</math> ppm); Cd (<math>\leq 0,3</math> ppm).</p> <p>3. Остаточные пестициды.</p> <p>4. Диоксид серы – ≤30 ppm.</p> <p>5. Зона ≤8,0 %</p>	<p>ВЭЖХ. Содержание бетамина (<math>C_5H_{11}NO_2</math>) в высушенных плодах не менее 0,5 %.</p> <p>Формула для расчета:</p> $\frac{m_{(mg, \text{бетамина стандарта})}}{A_t} \cdot A_c,$ <p>где <math>A</math> – площадь пиков</p> <p>HPLC.</p> <p>The content of betaine (<math>C_5H_{11}NO_2</math>) in dried fruits is not less than 0,5 %.</p> <p>Formula for calculation:</p> $\frac{m_{(mg, \text{rest betaine})}}{A_t} \cdot A_c,$ <p>where <math>A</math> is the area of the peaks</p>
<p><i>Wolfberry.</i></p> <p><i>Lycii fructus (Solanaceae).</i></p> <p>Плоды – ярко-оранжевые ягоды эллипсовидной формы длиной 1–2 см и <math>d = 3–8</math> мм</p> <p>The fruits are bright orange-red ellipsoid-shaped berries 1–2 cm long and <math>d = 3–8</math> mm</p>	<p><i>Taijedanskaya Kitajskaya farmakopeia</i> The Taiwan Chinese Pharmacopoeia Second Edition</p>	<p>1. Влажность.</p> <p>2. Общая зола.</p> <p>3. Зона, не растворимая в кислотах.</p> <p>4. Водорастворимые экстракты.</p> <p>5. TCX.</p> <p>6. Остатки пестицидов.</p> <p>7. Остаток серы диоксида.</p> <p>8. Тяжелые Me</p>	<p>1. Морфологические особенности.</p> <p>2. Микроскопические характеристики</p> <p>1. Morphological features.</p> <p>2. Microscopic characteristics</p>	<p>Экстрактивные вещества** (экстрагент – этанол, – ≥35,0 %) (экстрагент – вода, – ≥40,0 %)</p> <p>Extractives** (extractant – ethanol, – ≥35,0 %) (extractant – water, – ≥40,0 %)</p>

**Примечание.\*** Показатель «экстрактивные вещества» характеризует содержание в растительном сырье всей суммы биологически активных, извлекаемых экстрагентом.

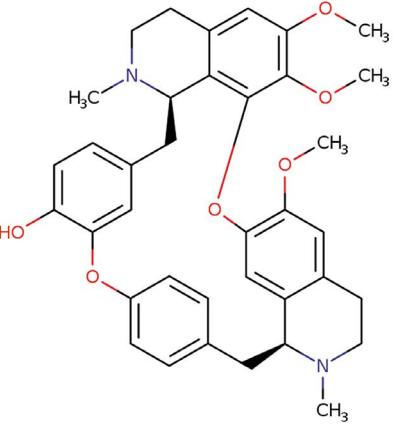
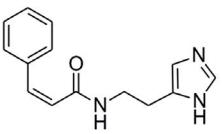
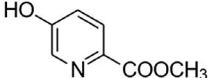
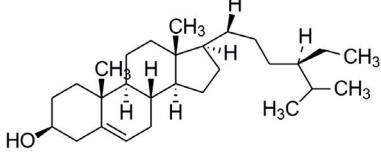
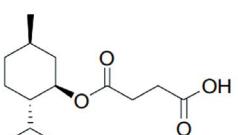
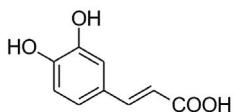
\*\* Тип экстрагента приводится в НД на лекарственное растительное сырье в зависимости от его последующего назначения.

**Note.\*** The indicator "extractive substances" characterizes the content in plant raw materials of the entire amount of biologically active extracted by the extractant.

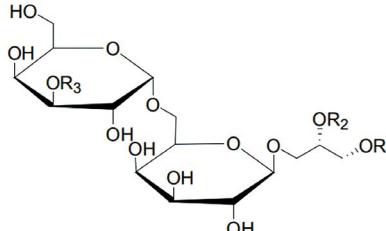
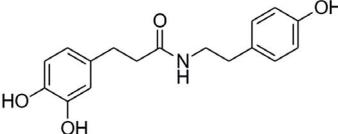
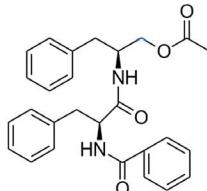
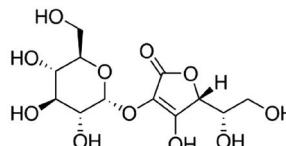
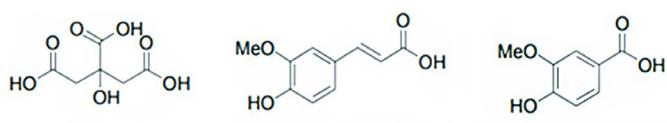
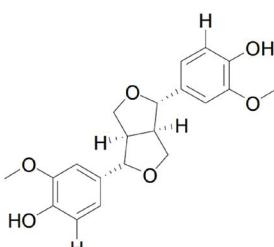
\*\* The type of extractant is given in the monograph on medicinal plant raw materials, depending on its subsequent purpose.

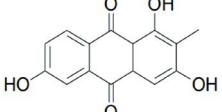
**Таблица 2. Примеры химических структур соединений из растений рода дерезы (*Lycium*)**

**Table 2. The examples of *Lycium* plants compounds chemical structures.**

Группы химических соединений Groups of chemical compounds	Структура, название, вид растительного сырья. Источник данных Structure, name and spices of raw materials. Source
<i>Алкалоиды</i> <i>Alkaloids</i>	
Группы изохинолина Isoquinoline alkaloids	 <p>Бербамин (6,6',7-триметокси-2,2'-диметил бербамин-12-ол). Плоды <i>L. barbarum</i> [13] Berbamine (6,6',7-Trimethoxy-2,2'-dimethyl berbaman-12-ol). <i>L. barbarum</i> fruits [13]</p>
Группы имидазола Imidazole alkaloids	 <p>Na-[(Z)-Циннамоил]-N1-метилгистамин. Листья <i>L. barbarum</i> [14] Na-[(Z)-Cinnamoyl]-N1-methylhistamine. <i>L. barbarum</i> leaves [14]</p>
Группы пиридина Pyridine alkaloids	 <p>Метиловый эфир 5-гидрокси-2-пиридин карбоновой кислоты. Плоды <i>L. barbarum</i> [15] Methyl 5-hydroxy-2-pyridinecarboxylat. <i>L. barbarum</i> fruits [15]</p>
Стероиды Steroids	 <p>β-Ситостерол. Плоды <i>L. chinense</i> [16] β-Sitosterol. <i>L. chinense</i> fruits [16]</p>
Терпеноиды Terpenoids	 <p>L-Монометилсукцинат. Плоды <i>L. barbarum</i> [17] L-Monomethyl succinate. <i>L. barbarum</i> fruits [17]</p>
Фенилпропаноиды Phenylpropanoids	 <p>E-Феруловая кислота. Кора корня <i>L. chinense</i> [18] E-Ferulic acid. <i>L. chinense</i> root bark [18]</p>

Продолжение таблицы 2

Группы химических соединений Groups of chemical compounds	Структура, название, вид растительного сырья. Источник данных Structure, name and splices of raw materials. Source
Глицерогалактолипиды Glycerogalactolipids	 <p>Галактолипиды А (R = Пальмитоил, R2, R3 = Линоленоил). Кора корня <i>L. Chinense</i> [19] Galactolipids A (R = Palmitoyl, R2, R3 = Linolenoyl). <i>L. chinense</i> root bark [19]</p>
Амиды Amides	 <p><i>N</i>-(α,β-Дигидрокаффеоил)тирамин Кора корня <i>L. Chinense</i> [20] <i>N</i>-(α,β-Dihydrocaffeoil)tyramine. <i>L. chinense</i> root bark [20]</p>
Пептиды Peptides	 <p>Лициумамид. Кора корня <i>L. Chinense</i> [21] Lyciumamide. <i>L. chinense</i> root bark [21]</p>
Витамины Vitamins	 <p>2-O-(α-D-Глюкопиранозил)-L-аскорбиновая кислота (α,α-2βG). Кора корня <i>L. Chinense</i> [22] 2-O-(α-D-Glucopyranosyl)-L-ascorbic acid (α,α-2βG). <i>L. Chinense</i> root bark [22]</p>
Органические кислоты Organic acids	 <p>лимонная кислота citric acid      феруловая кислота ferulic acid      ванилиновая кислота vanillic acid</p> <p>Листья <i>L. barbarum</i> [23] <i>L. barbarum</i> leaves [23]</p>
Лигнаны Lignans	 <p>4-O-(β-D-глюкопиранозил)сирингарезинол. Плоды <i>L. barbarum</i> [24] 4-O-(β-D-glucopyranosyl)syringaresinol. <i>L. barbarum</i> fruits [24]</p>

Группы химических соединений Groups of chemical compounds	Структура, название, вид растительного сырья. Источник данных Structure, name and splices of raw materials. Source
Антрахиноны Anthraquinones	 <p>6-Гидроксирубиадин. Кора корня <i>L. chinense</i> [25] 6-Hydroxyrubiadin. <i>L. chinense</i> root bark [25]</p>

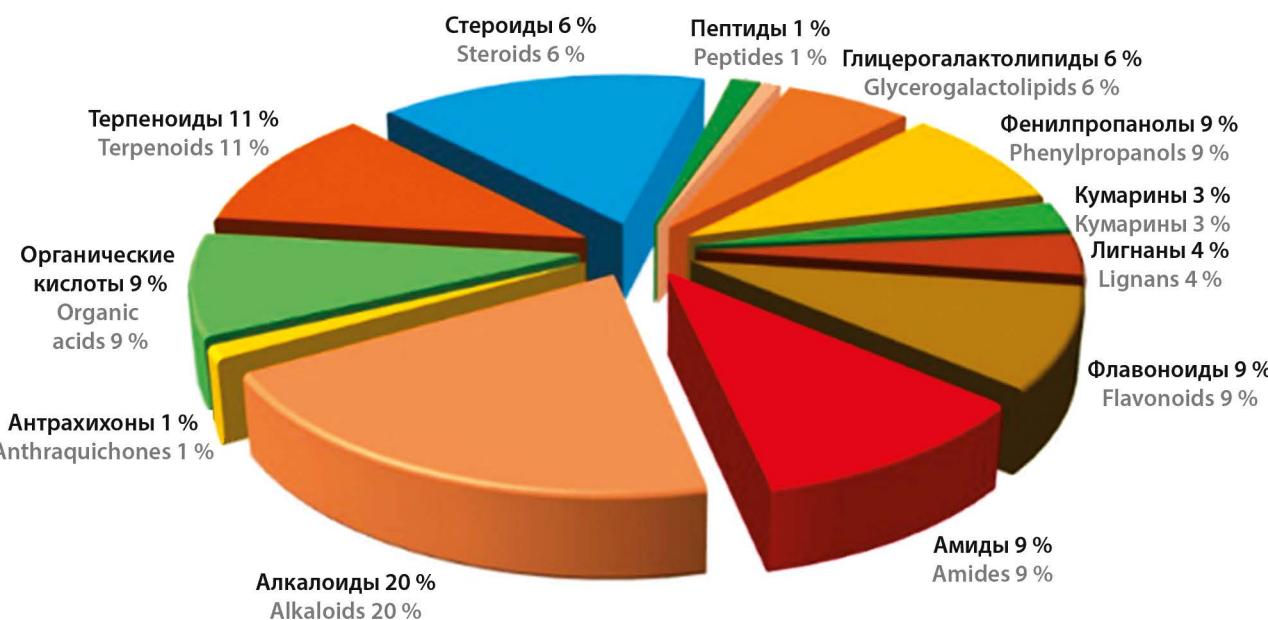


Рисунок 2. Доля биологически активных компонентов в растениях рода дерезы (*Lycium*)

Figure 2. The percentage of biologically active components in *Lycium* plants

### Некоторые примеры биологических эффектов компонентов растительного сырья дерезы (*Lycium*)

#### Антиоксидантная активность

Проявлению антиоксидантной активности способствуют в основном каротиноиды, флавоноиды, аскорбиновая кислота и ее производные (см. таблицу 2), а также полифенолы, содержащиеся в дерезе разных видов. Антиоксидантные эффекты полисахаридов LBPs были исследованы с помощью моделей *in vivo*. Результаты продемонстрировали повышение уровней супероксиддисмутазы (SOD) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) в сыворотке крови и значительно снижение содержания малонового диальдегида (MDA) [31]. Антиоксидантная функция LBPs показывает значительное повышение уровня оксида азота (NO) макрофагов, фагоцитарную способность и кислотную фосфатазу, а также антиоксидантную актив-

ность *in vitro* [32]. LBPs могут значительно повышать жизнеспособность клеток и регулировать окислительный стресс путем ингибиции активации каспазы-3 и уровней АФК *in vitro* [33]. Показано, что LBPs могут снижать уровни АФК за счет удаления свободных радикалов [34]. Активность антиоксидантных ферментов, уровни GSH и MDA у крыс, которым давали с пищей LBPs, снизились по сравнению с таковыми в контрольной группе ( $p < 0,01$ ) [35]. Антиоксидантная активность и механизмы LBPs показаны в таблице 4.

Другие виды биологической активности и механизм действия LBPs обобщены в таблице 5.

Табличные данные демонстрируют широкий спектр проявления компонентами дерезы биологической активности на примере многих систем организма. Понимание механизмов развития тех или иных эффектов даст возможность к разработке лекарственных средств на основе стандартизированного сырья.

**Таблица 3. Возможная структура повторяющихся звеньев, молекулярные массы и молярные соотношения полисахаридов в дереве (*Lycium*) [28]**

**Table 3. Possible structure of repeating units, molecular weights and molar ratios of polysaccharides in *Lycium* plants [28]**

Название Name	Mr (kDa) Molecular mass (kilo-Daltons)	Молярные соотношения Molar ratios	Структура повторяющихся звеньев Structure of repeating links
LbGp2	68,200	Ara:Gal = 4:5	(1 → 6)- $\beta$ -Gal- $\beta$ -Ara и (1 → 3)- $\beta$ -Gal (1 → 6)- $\beta$ -Gal- $\beta$ -Ara and (1 → 3)- $\beta$ -Gal
LbGp3	92,500	Ara:Gal = 1:1	(1 → 4)- $\beta$ -Gal(1 → 3)- $\beta$ -Ara и (1 → 3)- $\alpha$ -Gal(1 → 3)/(1 → 5)- $\alpha$ -Ara (1 → 4)- $\beta$ -Gal(1 → 3)- $\beta$ -Ara and (1 → 3)- $\alpha$ -Gal(1 → 3)/(1 → 5)- $\alpha$ -Ara
LbGp4	214,800	Ara:Gal:Rha:Glc = 1.5:2.5:0.43:0.23	(1 → 4)- $\beta$ -Gal(1 → 3)- $\beta$ -Gal(1 → 3)- $\alpha$ -Ara и (1 → 3)- $\beta$ -Rha (1 → 4)- $\beta$ -Gal(1 → 3)- $\beta$ -Gal(1 → 3)- $\alpha$ -Ara and (1 → 3)- $\beta$ -Rha
LBPA3	66,000	Ara:Gal = 1.2:1	Гетерополисахариды с (1 → 4), (1 → 6) Heteropolysaccharides (1 → 4), (1 → 6)
LBPB1	18,000	Ara:Glc = 1:3.1	Гетерополисахариды с (1 → 4), (1 → 6) $\beta$ -гликозидная связь Heteropolysaccharides (1 → 4), (1 → 6) $\beta$ -glycosidic bond
LBPC2	12,000	Xyl:Rha:Man = 8.8:2.3:1	Гетерополисахариды с (1 → 4), (1 → 6) $\beta$ -гликозидная связь Heteropolysaccharide (1 → 4), (1 → 6) $\beta$ -glycosidic bond
LBP3a-1	103,000	GalA (Gal и Ara)	Полигалактуроны с (1 → 4)- $\alpha$ -гликозидной связью Polygalacturonases (1 → 4)- $\alpha$ -glycosidic bond
LBP3a-2	82,000	GalA (Gal и Ara)	Полигалактуроны с (1 → 4)- $\alpha$ -гликозидной связью Polygalacturonases (1 → 4)- $\alpha$ -glycosidic bond
LBPL5-A	113,300		(1 → 3)-Gal, (1 → 4)-Gal, (1 → 3)-Araf, (1 → 5)-Araf, и (1 → 2, 4)-Rhaf (1 → 3)-Gal, (1 → 4)-Gal, (1 → 3)-Araf, (1 → 5)-Araf, and (1 → 2, 4)-Rhaf

**Таблица 4. Антиоксидантная активность и механизмы действия *L. barbarum* polysaccharide**

**Table 4. Antioxidant activity and mechanisms of *L. barbarum* polysaccharides action**

Активность Activity	Механизмы Mechanisms	Дозы Dose	Экспериментальная модель / Форма исследования Experimental model / Study form
Уменьшение окислительного стресса Reducing oxidative stress	Регуляция уровней MDA, SOD, GSH Regulation of MDA, SOD, GSH levels	100, 200, 400 мг/кг 100, 200, 400 mg · kg <sup>-1</sup>	Крысы. <i>In vivo</i> Rats. <i>In vivo</i>
Уменьшение повреждений, вызванных гипоксией Reduction of damage caused by hypoxia	Понижающее регулирование miR-122 Step-down regulation miR-122	300 мкг/мл 300 $\mu$ g · mL <sup>-1</sup>	Клетки. <i>In vitro</i> Cells. <i>In vitro</i>
Уменьшение гипероксической гипоксии Reduction of hyperoxic hypoxia	Индукционная активация Nrf2 Induced activation of Nrf2	100 мг/кг 100 mg · kg <sup>-1</sup>	Мышь. <i>In vivo</i> Mouse. <i>In vivo</i>
Ослабление диабетической дисфункции яичек Weakening of diabetic testicular dysfunction	Повышенная экспрессия белка p-PI3K и p-Akt Increased expression of p-PI3K and pAkt proteins	40 мг/кг 40 mg · kg <sup>-1</sup>	Мышь. <i>In vivo</i> Mouse. <i>In vivo</i>
Антирадикальная защита Anti-radical protection	Ловушка для свободных радикалов A trap for free radicals	IC 50: 1.29–3.00 мг/мл IC 50: 1.29–3.00 mg · mL <sup>-1</sup>	Химический реагент. <i>In vitro</i> Chemical reagent. <i>In vitro</i>
Регуляция активности ферментов Regulation of enzyme activity	Повышенная активность антиоксидантных ферментов Increased activity of antioxidant enzymes	200–400 мг/кг 200–400 mg · kg <sup>-1</sup>	Крысы. <i>In vivo</i> Rats. <i>In vivo</i>

**Таблица 5. Другие виды биологической активности *L. barbarum* polysaccharides**

**Table 5. Other types of biological activity of *L. barbarum* polysaccharides**

Биологическая активность Biological activity	Механизмы Mechanisms	Форма исследования Form of research
Уменьшение сосудистых поражений Reduction of vascular lesions	Регулирование сигнальных путей p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), ингибирование всасывания глюкозы Regulation of signaling pathways of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), inhibition of glucose absorption	<i>In vivo</i>
Предотвращение повреждения, вызванного ультрафиолетом Prevention of damage caused by ultraviolet radiation	Активация фактора Nrf2 Activation of factor Nrf2	<i>In vitro</i>
Защита печени от гепатотоксичности Protection of the liver from hepatotoxicity	Регулирование окислительного стресса Regulation of oxidative stress	<i>In vivo</i>
Облегчение болезни сухих глаз Relief of dry eye disease	Тест Ширмера (Dry Eye Test), измерение времени разрыва слезной пленки Schirmer Test (Dry Eye Test), measurement of tear film rupture time	<i>In vivo</i>
Защита от нейротоксичности Protection against neurotoxicity	Усиление путей клеточной сигнализации Nrf2/HO-1 Enhancement of Nrf2/HO-1 cellular signaling pathways	<i>In vivo</i>

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная обзорная статья посвящена текущему состоянию и перспективам разработки нормативных документов государственных фармакопей не только на различные морфологические группы, но и препараты из сырья дерезы (*Lycium*). Актуальность работы обусловлена тем, что сырье дерезы привлекает внимание приверженцев народной медицины на протяжении многих столетий благодаря накопленным данным о проявлении им разнообразных биологических эффектов – сырье *Lycium* продемонстрировало химический состав, богатый биологически активными веществами (алкалоидами, терпеноидами, витаминами, флавоноидами, углеводами). Для контроля качества некоторых видов сырья (высушенные плоды, кора корней) разработаны междисциплинарные подходы, включающие методики химического и фармакогностического анализа, а также разработку монографий государственных фармакопей. Однако в действующих нормативных документах на сырье дерезы не принимается во внимание ее различное биологическое происхождение, несмотря на разницу в химическом профиле и их фармакологической активности: *L. barbarum* – широко распространен в то время как *L. chinense* дополнительно используется в качестве эквивалента в некоторых стандартах. Поэтому до сих пор остается открытым вопрос об их взаимозаменяемости. Будущие исследования в области фармацевтической химии и фармакогнозии сырья растений *Lycium* должны быть сосредоточены и на других видах (*Lycium ruthenicum*), произрастающих, в том числе и на территории РФ. Данный факт необходимо учитывать при составлении нормативных документов на ЛРС.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Christen P., Kapetanidis I. Flavonoids from *Lycium halimifolium*. *Planta Med.* 1987;53(6):571–572. DOI: 10.1055/s-2006-962816.
- Khan I., Qayum A., Qureshi Z. Study of the hypotensive action of berbamine, an alkaloid isolated from *berberis yceum*. *Life Sci.* 1969; 8(17):993–1001. DOI: 10.1016/0024-3205(69)90432-9.
- Andoni E., Curone G., Agradi S., Barbato O., Menchetti L., Vigo D., Zelli R., Cotozzolo E., Ceccarini M. R., Faustini M., Quattrone A., Castrica M., Breccia G. Effect of Goji Berry (*Lycium barbarum*) Supplementation on Reproductive Performance of Rabbit. *Does. Animals (Basel)*. 2021;11(6):1672–1679. DOI: 10.3390/ani11061672.
- Dafni A., Yaniv Z. Solanaceae as medicinal plants in Israel. *J Ethnopharmacol.* 1994;44(1):11–18. DOI: 10.1016/0378-8741(94)90093-0.
- Qian D., Zhou H., Fan P., Yu T., Patel A., O'Brien M., Wang Z., Lu S., Tong G., Shan Y., Wang L., Gao Y., Xiong Y., Zhang L., Wang X., Liu Y., Zhou S. A Traditional Chinese Medicine Plant Extract Prevents Alcohol-Induced Osteopenia. *Front Pharmacol.* 2021;12(1):754–788. DOI: 10.3389/fphar.2021.754088.
- Bukhari S. M. F., Ali G., Abbas S. R., Anjum Z., Ahmed N., Munir A., Wali A., Ayub M., Khan K., Khames A., Musthafa M. M. Ethnobotanical and Biochemical Study of *Berberis lyceum Royle* Collected from Different Areas of Azad Jammu and Kashmir. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:1–9. DOI: 10.1155/2021/9916305.
- Lin L., Jin L., Wang Z. H., Cui Z. J., Ma Y. Prediction of the potential distribution of Tibetan medicinal *Lycium ruthenicum* in context of climate change. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine.* 2017;42(14):2659–2669. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.2017.0117.
- Levin R. A., Miller J. S. Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *Am J Bot.* 2005;92(12):2044–2053. DOI: 10.3732/ajb.92.12.2044.
- Sekinaeva M. A., Serebryanova F. K., Denisenko O. N., Lyashenko S. S. The study of the anatomical features of the herb Dereza vulgaris (*Lycium barbarum* L.). *Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya*. 2015;9(2):231–235. (In Russ.)
- Yao R., Heinrich M., Weckerle C. S. The genus *Lycium* as food and medicine: botanical, ethnobotanical and historical review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2018;212:50–66. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.010.
- Qian D., Zhao Y., Yang G., Huang L. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules.* 2017;22(6):911–944. DOI: 10.3390/molecules22060911.
- Yanjie G., Yifo W., Yuqing W., Fang G., Zhigang C. *Lycium Barbarum*: A Traditional Chinese Herb and A Promising Anti-Aging Agent. *Aging and disease.* 2017;8(6):778–791. DOI: 10.14336/AD.2017.0725.

13. Wong C. W., Seow W. K., Zeng T. S., Halliday W. J., Thong Y. H. Comparative immunopharmacology and toxicology of the bisbenzylisoquinoline alkaloids tetrandrine and berbamine. *Int J Immunopharmacol.* 1991;13(5):579–85. DOI: 10.1016/0192-0561(91)90079-m.
14. Chiale C. A., Cabrera J. L., Juliani H. R. N- $\alpha$ -Cinnamoyl-histamine derivaives from *Lycium cestroides*. *Phytochemistry.* 1990;29(2):688–689. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85152-6.
15. Li J., Pan L., Naman C. B., Deng Y., Chai H., Keller W. J., Kinghorn A. D. Pyrrole alkaloids with potential cancer chemopreventive activity isolated from a goji berry-contaminated commercial sample of African mango. *J. Agric. Food Chem.* 2014;62:5054–5060. DOI: 10.1021/jf500802x.
16. Redgwell R. J., Carti D., Wang J., Dobrukhovskaya J. M., Gerwig G. J., Kamerling J. P., Bucheli P. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 1. Characterisation of soluble and insoluble polymer fractions. *Carbohydrate Polymers.* 2011;84(4):1344–1349. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.01.032.
17. Hiserodt R. D., Adedeji J., John T. V., Dewis M. L. Identification of monomethyl succinate, monomethyl glutarate, and dimethyl glutarate in nature by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2004;52(11):3536–3541. DOI: 10.1021/jf049798m.
18. Li X.-N., Chu C., Tong S.-Q., Cheng D.-P., Yang J.-Z. A new furolactone-type lignan from *Lycium chinense*. *Nat. Prod. Res.* 2013;27:750–752. DOI: 10.1080/14786419.2012.698408.
19. Yan Y., Ran L., Cao Y., Qin K., Zhang X., Luo Q., Jabbar S., Abid M., Zeng X., Jabbar S., Abid M., Zeng X. Nutritional, Phytochemical Characterization and Antioxidant Capacity of Ningxia Wolfberry (*Lycium barbarum* L.). *J.Chem.Soc.Pak.* 2014;36(6):1079–1087.
20. Xie L.-W., Atanasov A. G., Guo D.-A., Malainer C., Zhang J.-X., Zehl M., Guan S.-H., Heiss E. H., Urban E., Dirsch V. M., Kopp B. Activity-guided isolation of NF- $\kappa$ B inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller. *Journal of Ethnopharmacology.* 2014;152(3):470–477. DOI: 10.1016/j.jep.2014.01.029.
21. Yahara, S., Shigeyama C., Ura T., Wakamatsu K., Yasuhara T., Nohara T. Cyclic peptides, acyclic diterpene glycosides and other compounds from *Lycium chinense* Mill. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1993;41(4):703–709. DOI: 10.1248/cpb.41.703.
22. Wu D.-T., Lam S.-C., Cheong K.-L., Feng W., Lin P.-C., Long Z.-R., Lv X.-J., Jing Z., Ma S.-C., Li S.-P. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2016;129:210–218. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.07.005.
23. Zhao J., Li H., Xi W., An W., Niu L., Cao Y., Wang H., Wang Y., Yin Y. Changes in sugars and organic acids in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fruit during development and maturation. *Food Chemistry.* 2015;173:718–724. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.082.
24. Zhou Z.-Q., Xiao J., Fan H.-X., Yu Y., He R.-R., Feng X.-L., Kurihara H., So K.-F., Yao X.-S., Gao H. Polyphenols from wolfberry and their bioactivities. *Food Chemistry.* 2016;214:644–654. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.105.
25. Wu Y., Jin F., Wang Y., Li F., Ren Z., Wang Y. In vitro and in vivo inhibitory effects of 6-hydroxyrubiadin on lipopolysaccharide-induced inflammation. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2017;39(3):107–116. DOI: 10.1080/08923973.2017.1295053.
26. Wu D.-T., Lam S.-C., Cheong K.-L., Feng W., Lin P.-C., Long Z.-R., Lv X.-J., Jing Z., Ma S.-C., Li S.-P. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2016;129:210–218. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.07.005.
27. Xie J.-H., Tang W., Jin M.-L., Li J.-E., Xie M.-Y. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp. *Structures and functionalities. Food Hydrocolloids.* 2016;60:148–160. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.03.030.
28. Yang J., Wei Y.-Q., Ding J.-B., Li Y.-L., Ma J.-L., Liu J.-L. Research and application of *Lycii Fructus* in medicinal field. *Chinese Herbal Medicines.* 2018;10(4):339–352. DOI: 10.1016/j.chmed.2018.08.006.
29. Gao Z., Ali Z., Khan I. A. Glycerogalactolipids from the fruit of *Lycium barbarum*. *Phytochemistry.* 2008;69(16):2856–2861. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.09.002.
30. Kocayigit E., Sanlier N. A Review of Composition and Health Effects of *Lycium barbarum*. *International Journal of Chinese Medicine.* 2017;1:1–9. DOI: 10.11648/j.ijcm.20170101.11.
31. Shan X., Zhou J., Ma T., Chai Q. *Lycium barbarum* Polysaccharides Reduce Exercise-Induced Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2011;12(2):1081–1088. DOI: 10.3390/ijms12021081.
32. Gong G., Dang T., Deng Y., Han J., Zou Z., Jing S., Zhang Y., Liu Q., Huang L., Wang Z. Physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from *Lycium barbarum* prepared by fractional precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018;109:611–618. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.017.
33. Chen L., Li W., Qi D., Wang D. *Lycium barbarum* polysaccharide protects against LPS-induced ARDS by inhibiting apoptosis, oxidative stress and inflammation in pulmonary endothelial cells. *Free Radical Research.* 2018;52(4):480–490. DOI: 10.1080/10715762.2018.1447105.
34. Liu L., Lao W., Ji Q.-S., Yang Z.-H., Yu G.-C., Zhong J.-X. *Lycium barbarum* polysaccharides protected human retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Int. J. Ophthalmol.* 2015;8(1):11–16. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.01.02.
35. Wu H.-T., He X.-J., Hong Y.-K., Ma T., Xu Y.-P., Li H.-H. Chemical characterization of *Lycium barbarum* polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2010;46(5):540–543. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.02.010.



Оригинальная статья / Research article

## Получение каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ее характеристика

Н. С. Пивоварова<sup>✉</sup>, Т. С. Шебитченко, 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. Профессора Попова, 14, лит. А

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Пивоварова Надежда Сергеевна. E-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

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

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 12.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Выращивание биомассы растительных клеток как метод получения сырья существует довольно долгое время. Растительные клетки, культивируемые *in vitro*, выступают в роли источника ценных вторичных метаболитов, таких как фенолы, алкалоиды, фитостероиды, гликозиды и др. Важно создать такие условия, при которых в штаммах будет наблюдаться накопление ценных биологически активных веществ. Культивирование предполагает использование сложных многокомпонентных питательных сред, содержащих определенный набор макро-, микроэлементов, витаминов, стимуляторов роста. Шалфей лекарственный обладает широким спектром фармакологического действия. В связи с ограниченным ареалом произрастания шалфея лекарственного, а также с ухудшением экологической обстановки в регионах произрастания использование фитобиотехнологического метода получения сырья является актуальным.

**Цель.** Получить жизнеспособную каллусную культуру шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.).

**Материалы и методы.** В качестве эксплантов использованы листья интактного растения шалфея лекарственного, семейства Яснотковые (*Salvia officinalis*, *Lamiaceae*). Предварительную стерилизацию эксплантов осуществляли 6%-м раствором гипохлорита натрия в течение 20 минут и этианолом 70%-м – 1 минуты. Культивировали на питательной среде по прописи Мурасиге – Скуга. Определение жизнеспособности клеток с использованием витальных красителей оценивали при помощи микроскопии (микроскоп цифровой Bresser LCD 50x-2000x, Германия). Высокоэффективную тонкослойную хроматографию проводили с использованием системы HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Швейцария).

**Результаты и обсуждение.** После двух недель культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование первичного каллуса. Визуально он представлял собой тонкий слой интенсивно делящихся недифференцированных клеток светло-жёлтого цвета. В течение культивирования нарастала биомасса полученного каллуса, он становился более рыхлым и приобретал более темный оттенок, также начинала темнеть питательная среда. Обнаруженные клетки при микроскопии можно разделить на два типа: первый тип – клетки меристематического типа, второй тип – клетки паренхимного типа. Микроскопия показала, что более 95 % всех визуализированных клеток живые. В следующих пассажах существенных изменений морфотипа культуры отмечено не было. В одиннадцатом пассаже проведено исследование ростовой активности штамма. Максимальная удельная скорость роста 0,42 сут<sup>-1</sup> наблюдается на 14–18 сутки роста, при этом показатель времени удвоения биомассы наименьший и соответствует значению 1,66 суток. За один цикл культивирования количество биомассы увеличивается в 7,73 раза. Результаты качественного анализа методом ВЭТСХ показывают, что качественный состав биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

**Заключение.** Получен жизнеспособный стабильный штамм растительных клеток шалфея лекарственного на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4-дихлорфеноксикускусная кислота (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Для следующих пассажей рекомендовано использование питательной среды по прописи Мурасиге – Скуга с полным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами α-нафтилкускусная кислота (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Основную массу полученного гетерогенного каллуса составляют клетки меристематического и паренхимного типа. Качественный состав БАВ биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

**Ключевые слова:** стерилизация эксплантов, ростовая активность, каллус, питательная среда

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

**Вклад авторов.** Н. С. Пивоварова, Т. С. Шебитченко, О. Н. Абросимова осуществили постановку задачи, выполнение эксперимента, обработку полученных данных, обсуждение результатов и написание 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:** Пивоварова Н. С., Шебитченко Т. С., Абросимова О. Н. Получение каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ее характеристика. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):40–46. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-40-46>

## Obtaining Callus Culture of Sage Medicinal (*Salvia officinalis* L.) and its Characteristics

Nadezhda S. Pivovarova<sup>✉</sup>, Tatyana S. Shebitchenko, Olesya N. Abrosimova

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Nadezhda S. Pivovarova. E-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

© Пивоварова Н. С., Шебитченко Т. С., Абросимова О. Н., 2022  
© Pivovarova N. S., Shebitchenko T. S., Abrosimova O. N., 2022

ORCID: Nadezhda S. Pivovarova – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; Tatyana S. Shebitchenko – <https://orcid.org/0000-0003-1423-4492>;  
Olesya N. Abrosimova – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>.

Received: 06.09.2022      Revised: 12.10.2022      Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** Cultivation of biomass of plant cells as a method of obtaining raw materials has existed for quite a long time. Plant cells cultivated in vitro act as a source of valuable secondary metabolites such as phenols, alkaloids, phytosteroids, glycosides, etc. It is important to create conditions under which the accumulation of valuable biologically active substances will be observed in the strains. Cultivation involves the use of complex multicomponent nutrient media containing a certain set of macro-, microelements, vitamins, growth stimulants. *Salvia officinalis* has a wide spectrum of pharmacological action. Due to the limited growing area of medicinal sage, as well as the deterioration of the ecological situation in the growing regions, the use of a phytobiotechnological method for obtaining raw materials is relevant.

**Aim.** The aim of the study is to obtain a viable callus culture of *salvia officinalis* (*Salvia officinalis* L.).

**Materials and methods.** Leaves of an intact plant sage medicinal, of the Lamiaceae family (*Salvia officinalis*, *Lamiaceae*) were used as explants. The explants were pre-sterilized with 6 % sodium hypochlorite solution for 20 minutes and 70 % ethanol for 1 minute. It was cultivated on a nutrient medium according to the Murasig – Skoog recipe. Determination of cell viability using vital dyes was assessed using microscopy (digital microscope Bresser LCD 50x-2000x, Germany). High performance thin layer chromatography was performed using a HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Switzerland).

**Results and discussion.** After two weeks of cultivation, the formation of primary callus was observed on the surface of the explants. Visually, it was a thin layer of intensely dividing undifferentiated light yellow cells. During cultivation, the biomass of the resulting callus increased, it became looser and acquired a darker shade, and the nutrient medium also began to darken. The detected cells during microscopy can be divided into two types: the first type is cells of the meristematic type, the second type is cells of the parenchymal type. Microscopy showed that more than 95 % of all visualized cells are alive. In the following passages, no significant changes in the morphotype of the culture were noted. In the eleventh passage, a study of the growth activity of the strain was carried out. The maximum specific growth rate of  $0.42 \text{ day}^{-1}$  is observed on the 14–18th day of growth, while the biomass doubling time is the smallest and corresponds to the value of 1.66 days. During one cultivation cycle, the amount of biomass increases by 7.73 times. The results of a qualitative analysis by the method of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) show that the qualitative composition of the biomass of medicinal sage is generally close to that of intact plants.

**Conclusion.** A viable stable strain of plant cells of *salvia officinalis* was obtained on a nutrient medium according to the Murasig – Skoog recipe with a half content of micro- and macrosols and phytohormones 2,4-D (6 mg/ml) and kinetin (1 mg/ml). For the following passages, it is recommended to use a nutrient medium according to the Murasig – Skoog recipe with a full content of micro and macrosols and phytohormones naphthalacetic acid (1 mg/ml) and kinetin (1 mg/ml). The bulk of the obtained heterogeneous callus is made up of cells of the meristematic and parenchymal type. The qualitative composition of BAS biomass of medicinal sage is generally close to that of intact plants.

**Keywords:** sterilization of explants, growth activity, callus, nutrient medium

**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, Tatyana S. Shebitchenko, Olesya N. Abrosimova carried out the statement of the problem, implementation of the experiment, processing of obtained data, discussion of the results, and writing the text of the article.

**Funding.** The results of the work were obtained using the equipment of the Central Collective Use Center "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SPHFU of the Ministry of Health of Russia" under agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with financial support from the Ministry of Education and Science of Russia.

**For citation:** Pivovarova N. S., Shebitchenko T. S., Abrosimova O. N. Obtaining callus culture of sage medicinal (*Salvia officinalis* L.) and its characteristics. *Drug development & registration*. 2022;11(4):40–46. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-40-46>

## ВВЕДЕНИЕ

Выращивание биомассы растительных клеток как метод получения сырья существует довольно долгое время. Растительные клетки, культивируемые *in vitro*, выступают в роли источника ценных вторичных метаболитов таких как фенолы, алкалоиды, фитостероиды, гликозиды и др. [1–6]. Основное направление исследований в этой области заключается в подборе оптимальных составов питательных сред и условий культивирования. Поэтому очень важно создать такие условия, при которых в штаммах будет наблюдаться накопление ценных биологически активных веществ (БАВ). Прежде чем использовать биомассу в качестве лекарственного сырья, необходимо

получить по возможности более полную характеристику роста штамма. Это даст возможность правильно оценить и прогнозировать рациональные сроки и условия для выращивания культуры клеток. Культивирование предполагает использование сложных многокомпонентных питательных сред, содержащих определенный набор макро-, микроэлементов, витаминов, стимуляторов роста. Однако не существует универсальных протоколов для получения штаммов – суперпродуцентов [7, 8]. Для каждого вида растений необходимо искать индивидуальный подход, с учетом состава питательных сред, параметров культивирования и т. д. Шалфей лекарственный обладает широким спектром фармакологического действия. Антисептическое, противовоспалительное, болеутво-

ляющее и другие свойства давно применяются как в народной, так и в научной медицине [9, 10]. В связи с ограниченным ареалом произрастания шалфея лекарственного, а также с ухудшением экологической обстановки в регионах произрастания использование фитобиотехнологического метода получения сырья является актуальным [11, 12].

**Целью исследования** являлось получение жизнеспособной каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В качестве эксплантов использованы листья интактного растения шалфея лекарственного, семейства Яснотковые (*Salvia officinalis*, *Lamiaceae*), культивируемого в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (пос. Лемболово, Ленинградская область).

Гипохлорит натрия (CAS: 7681-52-9, АО «ЛенРеактив», Россия), этанол медицинский 95 % (ООО «РОСБИО», Россия), 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 йодистый (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), аминоуксусная кислота (CAS № 56-40-6, АО «ВЕКТОН», Россия), мезо-Инозит (CAS № 87-89-8, Merck KGaA, Германия), сахароза (CAS № 57-50-1, АО «ВЕКТОН», Россия), агар-агар (ГОСТ 17206-96, ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия), 2,4-дихлорfenоксикусная 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, АО «ВЕКТОН», Россия), нейтральный красный (CAS № 553-24-2, АО «ВЕКТОН», Россия), н-бутиловый спирт (CAS № 71-36-3, АО «ВЕКТОН», Россия), уксусная кислота ледяная (CAS № 64-19-7, АО «ВЕКТОН», Россия), а-нафтилуксусная кислота (НУК) (CAS № 86-87-3, Shijiazhuang Lemandou Chemicals Co., Ltd., Китай).

## Методы и оборудование

### Подготовка экспланта

Сбор растительного материала – шалфея лекарственного листья производился с соблюдением принципов биологической этики. Предварительную стерилизацию эксплантов осуществляли 6 % раствором гипохлорита натрия в течение 20 минут и этанолом 70 % – 1 минуту.

### Приготовление питательной среды по прописи Мурасиге – Скуга (MS)

Состав питательной среды по прописи MS представлен в таблице 1. Предварительно были приготовлены маточные растворы макросолей (калий азотнокислый, аммоний азотнокислый, калий фосфорнокислый 1-замещенный, магний сернокислый, 7-водный, кальций хлористый, 2-водный) и микросолей (натрий молибденовокислый, 2-водный, медь сернокислая(II), 5-водная, борная кислота, марганец сернокислый(II), 5-водный, цинк сернокислый, 7-водный, калий йодистый, кобальт хлористый без никеля(II), 6-водный), а также железа-хелат (железо сернокислое(II), безводное, трилон Б).

**Таблица 1.** Среда Мурасиге – Скуга для клеточных и тканевых культур

**Table 1.** Medium Murasige – Skoog for cell and tissue cultures

Компоненты питательной среды Nutrient medium components	Количество Quantity
Маточный раствор макросолей Concentrated solution of macrosalts	50 мл/л 50 ml/l
Маточный раствор микросолей Concentrated solution of microsalts	1 мл/л 1 ml/l
Железа хелат Iron salts	5 мл/л 5 ml/l
Тиамин гидрохлорид Thiamine hydrochloride	1 мг/л 1 ml/l
Пиридоксин Pyrithoxine	0,5 мг/л 0,5 mg/l
Никотиновая кислота Nicotinic acid	0,5 мг/л 0,5 mg/l
Мезо-инозит Meso-inositol	100 мг/л 100 mg/l
α-нафтилуксусная кислота α-naphthalacetic acid	2 мг/л 2 mg/l
Сахароза Sucrose	30 г/л 30 g/l
Агар-агар Agar-agar	7 г/л 7 g/l

**Примечание.** \* pH питательной среды 5,6–5,8.

**Note.** \* pH of the nutrient medium 5.6–5.8.

В питательной среде MS было уменьшено содержание маточных растворов макро- и микросолей в два раза и добавлены фитогормоны 2,4-Д в количестве 6 мг/мл и кинетин – 1 мг/мл. Режим стерилизации питательной среды: 15 минут при температуре  $120 \pm 1$  °C.

## Внесение экспланта на стерильную питательную среду

В условиях ламинарного шкафа ЛШ-Биоком-1 (ООО «Компания «БИОКОМ», Россия) листовую пластинку рассекали стерильным скальпелем (эксплант длиной 1,5–2 см, шириной 1 см) и помещали на питательную среду. Культивирование осуществляли на протяжении 11 пассажей в темноте, температура 27–28 °C, влажность 60–70 % [7].

## Определение жизнеспособности клеток с использованием витальных красителей [11, 13, 14]

В качестве витальных красителей использовали Эванс голубой и нейтральный красный. Результаты окрашивания оценивали при помощи микроскопии (микроскоп цифровой Bresser LCD 50x-2000x, Германия). Микроскопия клеток проводилась с применением техники «давленый» препарат при увеличении 200 и 400.

## Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)

ВЭТСХ с использованием системы HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Швейцария). Нанесение образцов производили с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (CAMAG AG, Швейцария) в количествах 2 и 5 мкл на пластины HPTLC Silica gel 60 F254, 20 × 10 см (Merck KGaA, Германия). Далее плас-

тины помещали в автоматическую камеру CAMAG® Automatic Developing Chamber 2 (ADC2) (CAMAG AG, Швейцария) с системой растворителей бутанол – уксусная кислота – вода (БУВ) в соотношении 4:1:5 соответственно. Элюирование продолжали до тех пор, пока фронт растворителя не достигал 85 мм от линии старта. Изображение получали с помощью CAMAG® TLC Visualize 2 (CAMAG AG, Швейцария). Детекцию пятен осуществляли в видимом и УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм. Полученные хроматограммы обрабатывали в графическом редакторе для нанесения размерной градуировки. Затем полученные пятна соотносили с нанесенной градуировкой и находили фактор удерживания  $R_f$  [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После двух недель культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование первичного каллуса. Визуально он представлял собой тонкий слой интенсивно делящихся недифференцированных клеток светло-желтого цвета. Далее первичный каллус переносили на свежую питательную среду по прописи MS с полным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами: НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). В течение культивирования нарастала биомасса полученного каллуса, он становился более рыхлым и приобретал более темный оттенок, также начинала темнеть питательная среда. Визуализация процесса представлена на рисунке 1.

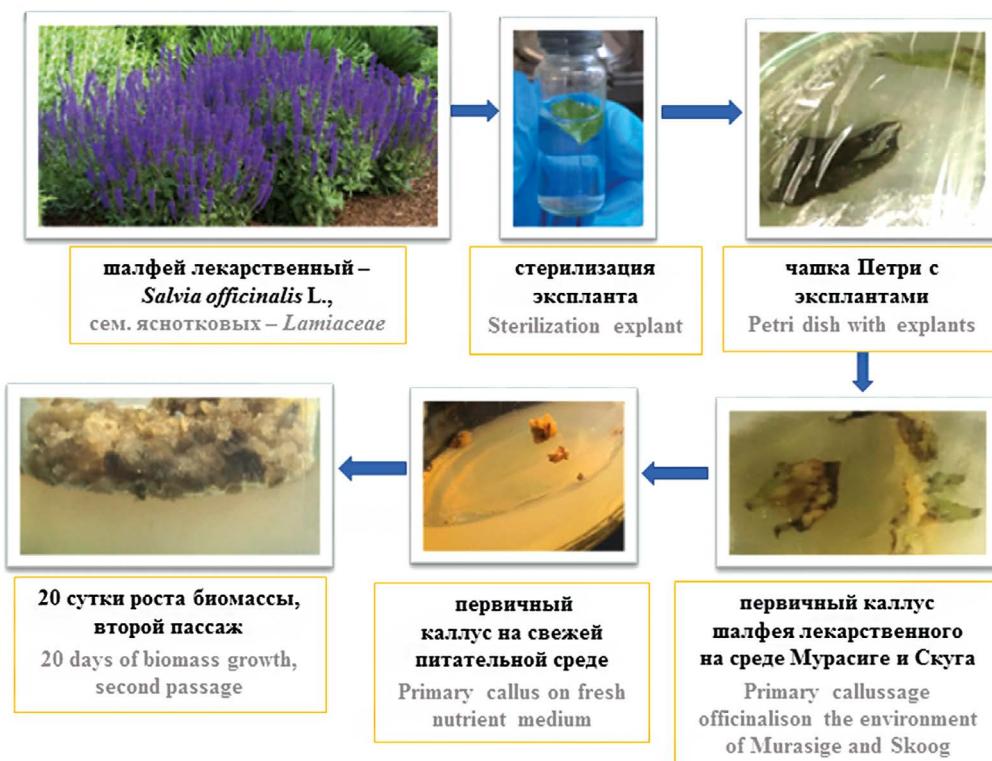


Рисунок 1. Визуализация введения шалфея лекарственного в культуру

Figure 1. Visualization of the introduction of *Salvia officinalis* into culture

После первого пассажа при пересадке часть биомассы взята для микроскопического анализа. Обнаруженные клетки можно разделить на два типа. Первый тип – клетки меристематического типа, которые имеют относительно небольшие размеры, крупные ядра, их вакуолизация слабо выражена. Второй тип – клетки паренхимного типа, которые имеют более крупные размеры и овальную, вытянутую форму. Микроскопия показала, что более 95 % всех визуализированных клеток живые. В следующих пассажах существенных изменений морфотипа культуры отмечено не было. Микроскопия представлена на рисунке 2.

В одиннадцатом пассаже проведено исследование ростовой активности штамма. Известно, что каллусные клетки в процессе роста проходят ряд фаз развития: лаг-фазу, экспоненциальную, стационарную, fazу гибели или деградации [16]. При этом наблюдается физиологическая асинхронность клеточной популяции. При помощи таких показателей, как индекс роста, удельная скорость и время удвоения биомассы можно охарактеризовать рост каллусных культур. Аналитические параметры роста каллусной культуры шалфея лекарственного представлены в таблице 2.

Анализируя полученные результаты, стоит отметить, что максимальная удельная скорость роста  $0,42 \text{ сут}^{-1}$  наблюдается на 14–18 сутки роста, при этом показатель времени удвоения биомассы наименьший и соответствует значению 1,66 суток. За один цикл культивирования количество биомассы увеличивается в 7,73 раза. В дальнейшем оценка показателей роста позволит оптимизировать состав при модификации питательной среды.

Из высущенной биомассы клеток и листьев шалфея лекарственного получены водно-спиртовые вытяжки (70%-й этианол), необходимые для проведения качественного анализа методом ВЭТСХ. Анализ выполнен на кафедре фармакогнозии СПбФУ. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 3.

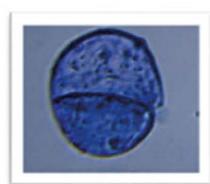
**Таблица 2. Аналитические параметры роста каллусной культуры шалфея лекарственного одиннадцатый пассаж (приведены среднеарифметические значения результатов трех определений, имеющих отклонение не более 5 %)**

**Table 2. Analytical parameters of growth of callus culture of sage officinalis eleventh passage (the arithmetic mean values of the results of three determinations with a deviation of no more than 5 % are given)**

Фаза роста Growth phase	Сутки роста Days of Growth	Удельная скорость роста (сут $^{-1}$ ) Specific growth rate (day $^{-1}$ )	Время удвоения биомассы (сут.) Biomass doubling time (day)	Индекс роста Growth index
Латентная Latent	2	0,09	7,62	0,18
Ускорения роста Accelerating growth	4	0,21	3,28	0,85
	7	0,20	3,44	1,41
Экспоненциального роста Exponential growth	11	0,28	2,47	3,09
	14	0,42	1,66	5,85
Замедленного роста Slow growth	18	0,42	1,66	7,53
	22	0,35	1,99	7,67
Стационарная Stationary	27	0,29	2,43	7,71
	30	0,26	2,69	7,73

На хроматограммах были обнаружены вещества с факторами удерживания  $R_f = 0,73; 0,6; 0,57; 0,52, 0,45; 0,4; 0,35; 0,27; 0,19$ . По данным литературных источников, эти соединения относятся к флавоноидам, фенолокислотам, танинам, аминокислотам, и соответствуют гидроксикоричной кислоте и гиперозиду, рутину, кверцетину, а также галловой и феруловой кислоте.

Таким образом, результаты показывают, что качественный состав биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений. Исследования по установлению структуры выявленных соединений, является перспективным направлением для дальнейшего изучения.



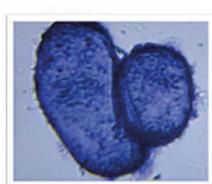
Одиночные делящиеся клетки меристематического типа (окраска Эванс голубым, ув. x 400)

Single dividing cells of the meristematic type (Evans blue coloring, magnification x 400)



Локальное скопление клеток паренхимного типа (окраска нейтральным красным, ув. x 200)

Local accumulation of parenchymal cells (neutral red staining, magnification x 200)



Локальное скопление клеток паренхимного типа (окраска Эванс голубым, ув. x 200)

Local accumulation of parenchymal cells (Evans blue staining, magnification x 200)

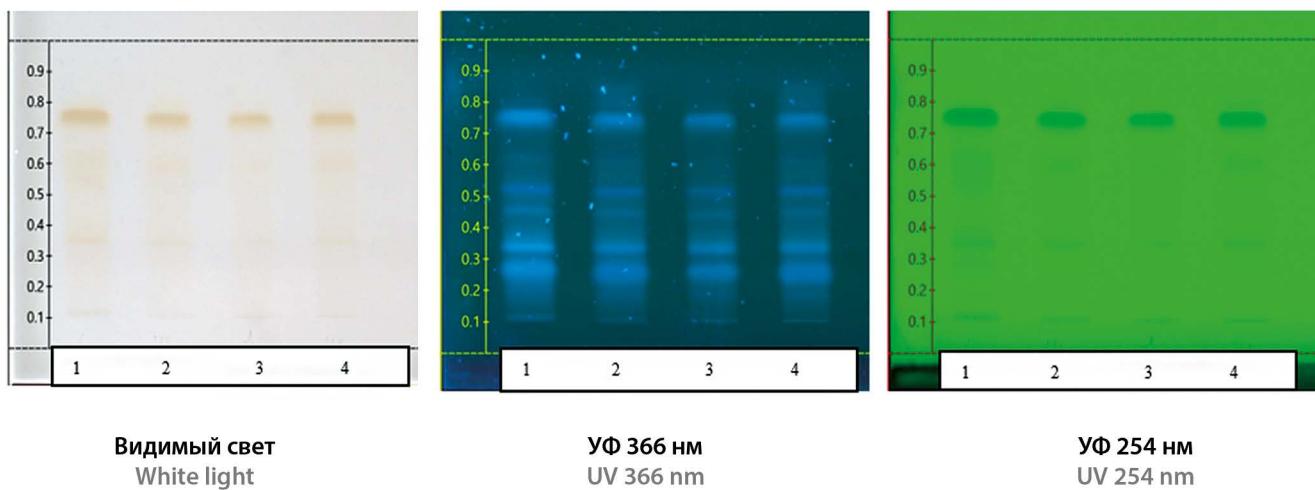


Скопление делящихся клеток меристематического типа (окраска нейтральным красным, ув. x 200)

Accumulation of dividing cells of the meristematic type (staining with neutral red, magnification x 200)

**Рисунок 2. Микроскопия клеток культуры шалфея лекарственного**

**Figure 2. Microscopy of cells of a culture of *Salvia officinalis***



**Рисунок 3. Хроматограммы водно-спиртовых вытяжек листьев (1, 2) и биомассы (3, 4) шалфея лекарственного**

**Figure 3. HPTLC profile of leaves (1, 2) and biomass (3, 4) extracts of *Salvia officinalis* L.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря проведенному исследованию получен жизнеспособный стабильный штамм растительных клеток шалфея лекарственного. Анализ результатов показывает, что для получения первичного каллуса необходимы следующие условия: среда по прописи MS с половинным содержанием микро- и макросолей и фитогормонами 2,4-Д (6 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Для следующих пассажей рекомендовано использование питательной среды по прописи MS с полным содержанием микро – и макросолей и фитогормонами НУК (1 мг/мл) и кинетин (1 мг/мл). Культивирование в темноте, температура 27–28 °С, влажность 60–70 %. Микроскопия показала, что основную массу полученного гетерогенного каллуса составляют клетки меристематического и паренхимного типа. Качественный состав БАВ биомассы шалфея лекарственного в целом близок к таковому у интактных растений.

## ЛИТЕРАТУРА

- Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248:1–18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
- Krasteva G., Georgiev V., Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in Life Sciences*. 2021;21:68–76. DOI: 10.1002/elsc.202000078.
- Kreis W. Exploiting plant cell culture for natural product formation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2019;92:216–225. DOI: 10.5073/JABFQ.2019.092.030.
- Тихомирова Л. И., Базарнова Н. Г., Ильчева Т. Н., Мартиросян Ю. Ц., Афанасenkova И. В. Получение растительного сырья ириса сибирского (*Iris Sibirica* L.) методами биотехнологии. *Химия растительного сырья*. 2018;4:235–245. DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
- Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M. Ion-exchange properties of the cell walls isolated from suspension-cultured plant cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2017;129(3):493–500. DOI: 10.1007/s11240-017-1194-7.
- Chirikova N. K., Olennikov D. N., Grigor'ev R. O. Acylquinic Acids, Flavonoids, and Maltol O-Glucoside from *Panax vietnamensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2019;55(6):1161–1163. DOI: 10.1007/s10600-019-02922-1.
- Каухова И. Е., Басевич А. В., Абросимова О. Н., Вайнштейн В. А. Лекарственные средства растительного происхождения. Технология, составы, стандартизация: монография. Спб.: Издательство Кнорус; 2019. 396 с.
- Томилова С. В., Ханды М. Т., Кочкин Д. В., Галишев Б. А., Клюшин А. Г., Носов А. М. Влияние синтетических аналогов ауксинов – 2,4-Д и а-НУК – на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. *Физиология растений*. 2020;67(4):389–399. DOI: 10.31857/S001533032004017X.
- Аминова М. З., Кароматов И. Д. Антибактериальные и противовоспалительные свойства лекарственного растения шалфей. *Биология и интегративная медицина*. 2018;10:41–55.
- Алексашина С. А., Макарова Н. В. Сравнительное изучение антиоксидантной активности, фенольных соединений и флавоноидов цветков липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), донника лекарственного (*Melilotus officinalis* L.), листьев смородины (*Ribes nigrum folia*), земляники лесной (*Fragaria vesca* L.), винограда (*Vitis labrusca*), произрастающих в самарском регионе. *Химия растительного сырья*. 2019;3:153–159. DOI: 10.14258/jcprm.2019034623.
- Вовк Д. А. Получение каллусной культуры шалфея лекарственного и изучение её ростовой активности. Молодая фармацевтика – потенциал будущего: сб. статей. 2020:487–490.
- Beckwith A. L., Borenstein J. T., Velásquez-García L. F. Tunable plant-based materials via in vitro cell culture using a *Zinnia elegans* model. *Journal of Cleaner Production*. 2021;125571:288. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.125571.
- Бурмистрова Н. А., Красавина М. С., Лунькова Н. Ф., Паничкин Л. А. Использование Эванса голубого и нейтрального красного для оценки жизнеспособности клеток. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2017;3:39–51.
- Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B., Nosov A. M. Characteristics of Eliciting Effects of Furostanol Glycosides on Cultured Yam Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(3):427–434. DOI: 10.1134/S1021443718020085.
- Хохлова Е. А. Контроль качества растительных препаратов промышленного и аптечного производства с использованием системы ВЭТСХ. Фармацевтическая отрасль. 2016;6(59):82–87.
- Загоскина Н. В. Биотехнология: теория и практика. М.: Издательство Оникс; 2009. 496 с.

## REFERENCES

1. Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C. A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 2018;248:1–18. DOI: 10.1007/s00425-018-2910-1.
2. Krasteva G., Georgiev V., Pavlov A. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in Life Sciences*. 2021;21:68–76. DOI: 10.1002/elsc.202000078.
3. Kreis W. Exploiting plant cell culture for natural product formation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2019;92:216–225. DOI: 10.5073/JABFQ.2019.092.030.
4. Tikhomirova L. I., Bazarnova N. G., Ilyicheva T. N., Martirosyan Yu. Ts., Afanasekova I. V. Obtaining plant raw materials of Siberian iris (*Iris Sibirica* L.) by methods of biotechnology. *Chemistry of plant raw materials*. 2018;4:235–245. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018043887.
5. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M. Ion-exchange properties of the cell walls isolated from suspension-cultured plant cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2017;129(3):493–500. DOI: 10.1007/s11240-017-1194-7.
6. Chirikova N. K., Olennikov D. N., Grigor'ev R. O. Acylquinic Acids, Flavonoids, and Maltol O-Glucoside from *Panax vietnamensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2019;55(6):1161–1163. DOI: 10.1007/s10600-019-02922-1.
7. Kaukhova I. E., Basevich A. V., Abrosimova O. N., Vainshtain V. A. Herbal medicines. Technology, compositions, standardization: monography. Saint-Petersburg: Knorus publishing; 2019. 396 p. (In Russ.)
8. Tomilova S. V., Khandy M. T., Kochkin D. V., Galishev B. A., Klu-shin A. G., Nosov A. M. The effect of synthetic analogs of auxins – 2,4-D and α-NAA – on the growth and biosynthetic characteristics of a suspension culture of *Tribulus terrestris* L. cells. *Plant physiology*. 2020;67(4):389–399. (In Russ.) DOI: 10.31857/S001533032004017X.
9. Aminova M. Z., Karomatov I. D. Antibacterial and anti-inflammatory properties of the sage medicinal plant. *Biology and Integrative Medicine*. 2018;10:41–55. (In Russ.)
10. Aleksashina S. A., Makarova N. V. Comparative study of antioxidant activity, phenolic compounds and flavonoids of flowers of the linden (*Tilia cordata* Mill.), Medicinal sage (*Salvia officinalis* L.), sweet clover (*Melilotus officinalis* L.), currant leaves (*Ribes nigrum folia*), wild strawberry (*Frangaria vesca* L.), grapes (*Vitis labrusca*) growing in the Samara region. *Chemistry of plant raw materials*. 2019;3:153–159. (In Russ.) DOI:10.14258/jcprm.2019034623.
11. Vovk D. A. Obtaining a callus culture of medicinal sage and studying its growth activity. *Young pharmacy – the potential of the future*. 2020:487–490. (In Russ.)
12. Beckwith A. L., Borenstein J. T., Velásquez-García L. F. Tunable plant-based materials via in vitro cell culture using a *Zinnia elegans* model. *Journal of Cleaner Production*. 2021;125571:288. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.125571.
13. Burmistrova N. A., Krasavina M. S., Lunkova N. F., Panichkin L. A. Evans' use of blue and neutral red to assess cell viability. *Izvestiya Timiryazevskoy selskohozyaistvennoi akademii*. 2017;3:39–51. (In Russ.)
14. Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B., Nosov A. M. Characteristics of Eliciting Effects of Furostanol Glycosides on Cultured Yam Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(3):427–434. DOI: 10.1134/S1021443718020085.
15. Khokhlova E. A. Quality control of industrial and pharmaceutical herbal preparations using the HPTLC system. *Pharmaceutical industry*. 2016;6(59):82–87. (In Russ.)
16. Zagorskina N. V. Biotechnology: theory and practice. Moscow: Onyx Publishing House; 2009. 496 p. (In Russ.)



## Разработка прогнозной модели оценки запасов лекарственных растений с помощью средств ГИС на примере Среднего Урала

А. Ю. Турышев<sup>✉</sup>, В. Д. Белоногова, В. Г. Лужанин

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Турышев Алексей Юрьевич. E-mail: aleksej2@mail.ru

ORCID: А. Ю. Турышев – <https://orcid.org/0000-0003-3867-5305>; В. Д. Белоногова – <https://orcid.org/0000-0001-8414-4367>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 17.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Интенсивное антропогенное воздействие приводит к резкому сокращению природных запасов многих ценных растений. В связи с этим, ранее полученные данные о запасах быстро устаревают. Поэтому инвентаризация запасов лекарственных растений в Российской Федерации в целом и на Среднем Урале, в частности, остается актуальной проблемой [5–7, 10]. К сожалению, в отечественной фармации современные технологии внедряются недостаточно интенсивно. По нашему мнению, причинами этого являются дорогостоящее программное обеспечение, недостаточность теоретических и практических навыков для работы на персональных компьютерах, а также специфика отрасли. Несмотря на это, применение географических информационных систем (ГИС) в фармации является достаточно перспективным. Использование географических информационных систем в качестве методологической основы позволит осуществить картирование ареалов лекарственных растений, провести анализ растительных сообществ не только для территории Среднего Урала на высоком научном уровне, но и других регионов при наличии соответствующих топооснов [1–4].

**Цель.** Разработка прогнозных моделей распространения лекарственных растений на основе комплексной оценки состояния популяций дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала.

**Материалы и методы.** Определение запасов сырья изучаемых видов лекарственных растений проводили на конкретных зарослях по общепринятой методике. Подлинность сырья устанавливали макроскопическим методом при сборе образцов сырья. В ходе исследования изучены запасы в 4652 популяций 27 видов лекарственных растений, произрастающих на территории Среднего Урала. Сбор материала проводили в период с 2006 по 2019 при обследовании административных районов Пермского края и Свердловской области. Сравнительную комплексную оценку ресурсоведческих и фитохимических показателей изучали на примере 6 видов дикорастущих лекарственных растений: *Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*, *Hypericum perforatum* L., *Hypericaceae* и *Hypericum maculatum* Crantz., *Hypericaceae*, *Tanacetum vulgare* L., *Asteraceae*, *Artemisia absinthium* L., *Asteraceae*, *Leonurus quinquelobatus* Gilib., *Lamiaceae*, *Achillea millefolium* L., *Asteraceae*.

**Результаты и обсуждение.** В ходе ресурсоведческих и фитохимических исследований представителей лекарственной флоры Среднего Урала проведена комплексная оценка состояния популяций дикорастущих лекарственных растений – источников лекарственного растительного сырья (*herba Origanii vulgaris*, *herba Hyperici*, *flores Tanaceti vulgaris*, *herba Artemisiae absinthii*, *herba Achilleae millefolii* и *herba Leonuri*). Проведен геопространственный анализ распределения популяций лекарственных растений по типам почв в пределах регионов Среднего Урала. Отработан алгоритм построения прогнозных моделей распространения популяций дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала. Разработан комплект карт «встречаемости» лекарственных растений на исследуемой территории.

**Заключение.** Проведенный комплекс исследований позволяет актуализировать информацию о лекарственной флоре Среднего Урала. Разработанный на примере ряда представителей лекарственной флоры Среднего Урала алгоритм построения прогнозных карт может использоваться для любых регионов при наличии соответствующих топооснов.

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

**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.

**Для цитирования:** Турышев А. Ю., Белоногова В. Д., Лужанин В. Г. Разработка прогнозной модели оценки запасов лекарственных растений с помощью средств ГИС на примере Среднего Урала. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):47–59. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-47-59>

## Development of a Predictive Model for Estimating Stocks of Medicinal Plants Using GIS Tools on the Example of the Middle Urals

Aleksey Yu. Turyshев<sup>✉</sup>, Valentina D. Belonogova, Vladimir G. Luzhanin

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Aleksey Yu. Turyshев. E-mail: aleksej2@mail.ru

**ORCID:** Aleksey Yu. Turyshev – <https://orcid.org/0000-0003-3867-5305>; Valentina D. Belonogova – <https://orcid.org/0000-0001-8414-4367>;  
Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

**Received:** 06.09.2022    **Revised:** 17.10.2022    **Published:** 25.11.2022

## **Abstract**

**Introduction.** Intensive anthropogenic impact leads to a sharp reduction in natural reserves of many valuable plants. In this regard, previously obtained data on stocks quickly become obsolete. Therefore, the inventory of stocks of medicinal plants in the Russian Federation as a whole and the Middle Urals, in particular, remains an urgent problem. Unfortunately, modern technologies are not being implemented intensively enough in the domestic pharmacy. In our opinion, the reasons for this are expensive software, insufficient theoretical and practical skills to work on personal computers, as well as the specifics of the industry. Despite this, the use of geographic information systems (GIS) in pharmacy is quite promising [7–9]. The use of geographical information systems as a methodological basis will make it possible to map the areas of medicinal plants, to analyze plant communities not only for the territory of the Middle Urals at a high scientific level [1, 4].

**Aim.** Development of predictive models for the distribution of medicinal plants based on a comprehensive assessment of the state of populations of wild medicinal plants of the Middle Urals.

**Materials and methods.** The determination of raw material reserves of the studied species of medicinal plants was carried out on specific thickets according to the generally accepted methodology. The authenticity of raw materials was established by the macroscopic method when collecting samples of raw materials. In the course of the study, stocks of 4652 populations of 27 species of medicinal plants growing in the Middle Urals were studied. The collection of the material was carried out in the period from 2006 to 2019 during the survey of the administrative districts of the Perm Krai and the Sverdlovsk region. A comparative comprehensive assessment of resource and phytochemical indicators was studied using the example of 6 species of wild medicinal plants: *Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*, *Hypericum perforatum* L., *Hypericaceae* and *Hypericum maculatum* Crantz, *Hypericaceae*, *Tanacetum vulgare* L., *Asteraceae*, *Artemisia absinthium* L., *Asteraceae*, *Leonurus quinquelobatus* Gilib., *Lamiaceae*, *Achillea millefolium* L., *Asteraceae*.

**Results and discussion.** In the course of resource and phytochemical studies of representatives of the medicinal flora of the Middle Urals, a comprehensive assessment of the state of populations of wild medicinal plants – sources of medicinal plant raw materials (*herba Origani vulgaris*, *herba Hyperici*, *flores Tanaceti vulgaris*, *herba Artemisiae absinthii*, *herba Achilleae millefolii* and *herba Leonuri*) was carried out. A geospatial analysis of the distribution of medicinal plant populations by soil types within the regions of the Middle Urals was carried out. An algorithm for constructing predictive models of the distribution of populations of wild medicinal plants of the Middle Urals has been worked out. A set of maps of the "occurrence" of medicinal plants in the study area has been developed.

**Conclusion.** The conducted complex of studies will allow updating information about the medicinal flora of the Middle Urals. Developed on the example of a number of representatives of the medicinal flora of the Middle Urals, the algorithm for constructing forecast maps can be used for any regions in the presence of appropriate topos.

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

**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.

**For citation:** Turyshev A. Yu., Belonogova V. D., Luzhanin V. G. Development of a predictive model for estimating stocks of medicinal plants using GIS tools on the example of the Middle Urals. *Drug development & registration.* 2022;11(4):47–59. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-47-59>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Интенсивное антропогенное воздействие приводит к резкому сокращению природных запасов многих ценных растений. В связи с этим, ранее полученные данные о запасах быстро устаревают. Поэтому инвентаризация запасов лекарственных растений в Российской Федерации в целом и на Среднем Урале, в частности, остается актуальной проблемой [5–7, 10].

К сожалению, в отечественной фармации современные технологии внедряются недостаточно интенсивно. По нашему мнению, причинами этого являются дорогостоящее программное обеспечение, недостаточность теоретических и практических навыков для работы на ПК, а также специфика отрасли. Несмотря

на это, применение ГИС-технологий в фармации является достаточно перспективным.

Использование географических информационных систем в качестве методологической основы позволит осуществить картирование ареалов лекарственных растений [7–9], провести анализ растительных сообществ не только для территории Среднего Урала на высоком научном уровне, но и других регионов при наличии соответствующих топосов [1–4].

**Целью исследования** являлась разработка прогнозных моделей распространения лекарственных растений на основе комплексной оценки состояния популяций дикорастущих лекарственных растений Среднего Урала.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала проводили в период с 2006 по 2019 гг. при обследовании административных районов Пермского края и Свердловской области.

Определение запасов сырья изучаемых видов лекарственных растений проводили на конкретных запросах по общепринятой методике. Подлинность сырья устанавливали макроскопическим методом при сборе образцов сырья. Исследованы запасы в 4652 популяциях 27 видов лекарственных растений, произрастающих на территории Среднего Урала.

Сравнительную комплексную оценку ресурсоведческих и фитохимических показателей изучали на примере 6 видов дикорастущих лекарственных растений: *Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*, *Hypericum perforatum* L., *Hypericaceae*, *Hypericum maculatum* Crantz, *Hypericaceae*, *Tanacetum vulgare* L., *Asteraceae*, *Artemisia absinthium* L., *Asteraceae*, *Leonurus quinquelobatus* Gilib., *Lamiaceae*, *Achillea millefolium* L., *Asteraceae*.

На основе полученного массива ресурсоведческих данных с использованием средств ГИС разработан комплект прогнозных карт встречаемости лекарственных растений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных ресурсоведческих исследований были включены в атрибутивную базу данных ГИС «Лекарственные растения Среднего Урала». На следующем этапе с использованием программного обеспечения ГИС нами было проведено сопостав-

ление информации, содержащейся в атрибутивной базе данных.

В основу разработки ГИС «Лекарственные растения Среднего Урала» была взята ГИС «Лекарственные растения Пермского края», созданная А.Ю. Турышевым при содействии ГИС – центра Пермского государственного национального исследовательского университета в 2007 году, в дальнейшем было продолжено ее наполнение [2–4].

В работе использовали топоосновы «Карта Свердловской области 1:200 000», «Карта Пермского края 1:200 000» находящиеся в свободном доступе, а также топоосновы «Типы почв» для регионов исследования, предоставленные ГИС – центром Пермского государственного национального исследовательского университета. В результате обследована лекарственная флора 25 районов Пермского края и 17 районов Свердловской области (рисунок 1).

В результате добавления атрибутов темы «Почвы» к теме «Лекарственные растения» была получена результирующая таблица, включающая приуроченность каждой конкретной популяции к типу почвы.

Итоговая таблица базы данных содержала суммарные данные по каждой популяции лекарственных растений, включая основные ресурсоведческие показатели запасов сырья, показатели оценки качества сырья с каждой популяции, а также тип почвы, к которой приурочена популяция.

После получения итоговой таблицы было изучено распределение популяций исследуемых видов по приуроченности лекарственных растений к типам

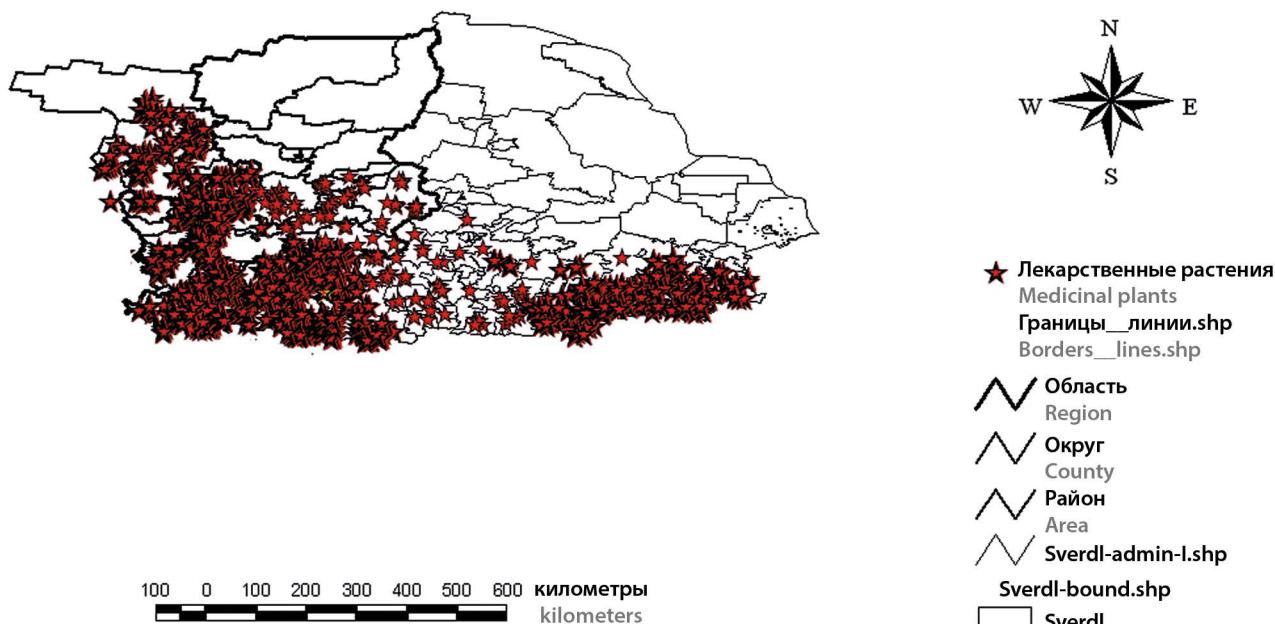


Рисунок 1. Лекарственные растения «Среднего Урала»

Figure 1. Medicinal plants of the "Middle Urals"

почв (в пределах Среднего Урала). Результаты проведенного анализа представлены на рисунке 2.

Результаты статистической оценки влияния типов почв на плотность запаса сырья (ПЗС) представлены в таблице 1.

Статистическая оценка влияния типа почв на ПЗС показала, что средняя плотность запасов травы душицы варьирует от  $37,48 \pm 2,02$  кг/га на аллювиальных дерновых кислых почвах до  $123,08 \pm 15,2$  кг/га на черноземах оподзоленных и увеличивается в ряду аллювиальные дерновые кислые < дерново-среднеподзолистые < светло-серые лесные < смываемые и намытые < черноземы оподзоленные (таблица 1).

Средняя плотность запасов травы зверобоя увеличивается в ряду: серые лесные < аллювиальные дерновые кислые < черноземы оподзоленные < светло-серые лесные < смываемые и намытые < дерново-среднеподзолистые (таблица 1).

Средняя плотность запасов цветков пижмы варьирует от  $90,20 \pm 10,82$  кг/га на дерново-сильноподзолистых и светло-серых лесных почвах до  $248,00 \pm 25,28$  кг/га на черноземах оподзоленных и уменьшается в ряду: черноземы оподзоленные > светло-серые лесные > серые лесные > дерново-среднеподзолистые > смываемые и намытые > аллювиальные дерновые кислые > дерново-сильноподзолистые.

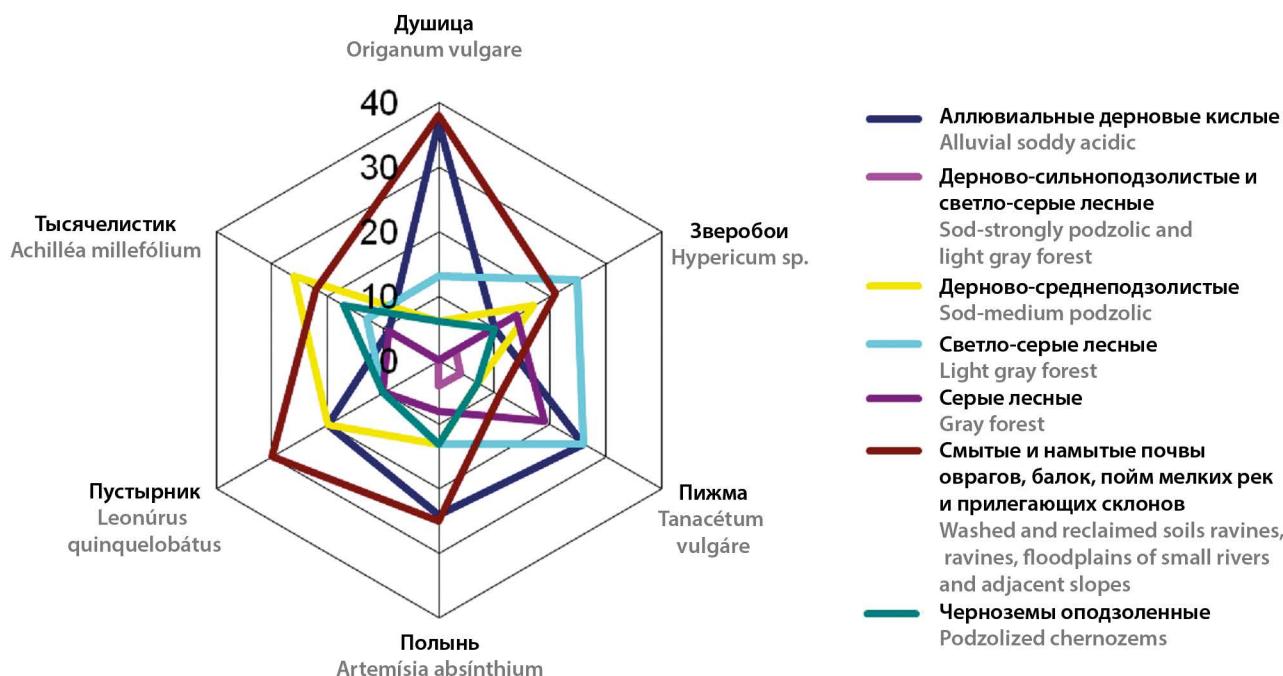


Рисунок 2. Распределение исследуемых популяций по типам почв, %

Figure 2. Distribution of the studied populations by soil types, %

Таблица 1. Сравнительный анализ плотности запасов сырья исследуемых видов по типам почв на территории Среднего Урала

Table 1. Comparative analysis of the density of raw materials stocks of the studied species by soil types in the territory of the Middle Urals

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he	t, 95*	$\eta^2, F^*$
Сравнительный анализ ПЗС травы душицы по типам почв Comparative analysis of the SDM of <i>Origanum vulgare</i> L. herb by soil types				
1	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	$37,48 \pm 2,02$	0,78	$\eta^2 = 63,86\%$ $p = 0,017$ $F_{\text{факт.}} = 4,86$ $F_{\text{теор. 0,05}} = 3,36$ $\eta^2 = 63,86\%$ $p = 0,017$ $F_{\text{fact.}} = 4,86$ $F_{\text{theor. 0,05}} = 3,36$
2	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	$46,31 \pm 11,20$	1,56	
3	Светло-серые лесные Light gray forest	$66,36 \pm 6,26$	2,02	
4	Смываемые и намытые Eroded and reclaimed	$81,28 \pm 3,90$	<b>2,66</b>	
5	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	$123,08 \pm 15,20$	<b>5,58</b>	

Продолжение таблицы 1

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he	t, 95*	η <sup>2</sup> , F*
<i>Сравнительный анализ ПЗС травы зверобоя по типам почв</i> <i>Comparative analysis of the SDM of Hypericum perforatum L. and Hypericum maculatum Crantz herb by soil types</i>				
6	Дерново-сильноподзолистые и светло-серые лесные Sod-strongly podzolic and light gray forest	42,10 ± 5,05	<b>4,07</b>	$\eta^2 = 18,57\%$ $p = 0,56$ $F_{факт.} = 0,84$ $F_{теор. 0,05} = 2,55$ $\eta^2 = 18,57\%$ $p = 0,56$ $F_{fact.} = 0,84$ $F_{theor. 0,05} = 2,55$
7	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	70,03 ± 4,65	0,78	
8	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	74,72 ± 3,76	0,27	
9.	Светло-серые лесные Light gray forest	76,19 ± 4,02	1,97	
10	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	90,76 ± 6,22	1,34	
11	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	104,71 ± 8,33	0,36	
12	Серые лесные Gray forest	108,41 ± 5,86	<b>8,57</b>	
<i>Сравнительный анализ ПЗС цветков пижмы в зависимости от типа почв</i> <i>Comparative analysis of the SDM of Tanacetum vulgare L. herb by soil types</i>				
13	Дерново-сильноподзолистые и светло-серые лесные Sod-strongly podzolic and light gray forest	90,20 ± 10,82	<b>4,46</b>	$\eta^2 = 23,46\%$ $p = 0,44$ $F_{факт.} = 1,02$ $F_{теор. 0,05} = 2,60$ $\eta^2 = 23,46\%$ $p = 0,44$ $F_{fact.} = 1,02$ $F_{theor. 0,05} = 2,60$
14	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	149,41 ± 7,71	0,32	
15	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	154,40 ± 13,79	1,28	
16	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	180,77 ± 15,36	0,47	
17	Серые лесные Gray forest	189,17 ± 8,96	<b>2,31</b>	
18	Светло-серые лесные Light gray forest	214,34 ± 6,23	<b>1,29</b>	
19	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	248,00 ± 25,28	<b>5,74</b>	
<i>Сравнительный анализ ПЗС травы полыни в зависимости от типа почв</i> <i>Comparative analysis of the SDM of Artemisia absinthium L. herb by soil types</i>				
20	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	80,13 ± 4,81	0,92	$\eta^2 = 15,80\%$ $p = 0,71$ $F_{факт.} = 0,63$ $F_{теор. 0,05} = 2,60$ $\eta^2 = 15,80\%$ $p = 0,71$ $F_{fact.} = 0,63$ $F_{theor. 0,05} = 2,60$
21	Светло-серые лесные Light gray forest	87,41 ± 6,33	0,55	
22	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	92,04 ± 5,67	1,93	
23	Дерново – сильноподзолистые и светло-серые лесные Sod – strongly podzolic and light gray forest	122,4 ± 14,69	0,03	
24	Серые лесные Gray forest	122,93 ± 7,20	0,63	
25	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	129,30 ± 7,08	1,09	
26	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	142,12 ± 9,40	<b>5,87</b>	

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he	t, 95*	$\eta^2$ , F*
<i>Сравнительный анализ ПЗС травы пустырника в зависимости от типа почв</i> <i>Comparative analysis of the SDM of Leonurus quinquelobatus Gilib. herb by soil types</i>				
27	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	120,03 ± 18,2	1,00	$\eta^2 = 39,66\%$ $p = 0,75$ $F_{\text{факт.}} = 0,53$ $F_{\text{теор.} 0,05} = 6,26$ $\eta^2 = 39,66\%$ $p = 0,75$ $F_{\text{fact.}} = 0,53$ $F_{\text{theor.} 0,05} = 6,26$
28	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	140,82 ± 10,06	0,84	
29	Светло-серые лесные Light gray forest	160,71 ± 21,30	0,78	
30	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	182,35 ± 17,66	0,48	
31	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	197,02 ± 25,20	0,67	
32	Серые лесные Gray forest	216,79 ± 15,70	4,03	
<i>Сравнительный анализ ПЗС травы тысячелистника в зависимости от типа почв</i> <i>Comparative analysis of the SDM of Achillea millefolium L. herb by soil types</i>				
33	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	26,93 ± 2,30	0,49	$\eta^2 = 34,63\%$ $p = 0,27$ $F_{\text{факт.}} = 1,41$ $F_{\text{теор.} 0,05} = 2,74$ $\eta^2 = 34,63\%$ $p = 0,27$ $F_{\text{fact.}} = 1,41$ $F_{\text{theor.} 0,05} = 2,74$
34	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	30,10 ± 6,12	1,49	
35	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	39,75 ± 2,27	2,00	
36	Темно-серые лесные Dark gray forest	53,86 ± 6,70	0,05	
37	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	54,24 ± 2,78	0,38	
38	Светло-серые лесные Light gray forest	56,24 ± 4,42	<b>2,93</b>	
39	Серые лесные Gray forest	75,90 ± 5,04	<b>8,83</b>	

**Примечание.** \* t, 95 – критерий Стьюдента при доверительной вероятности 95 %;  $\eta^2$  – сила влияния типа почв на плотность запаса сырья; F – критерий Фишера.

**Note.** \* t, 95 – Student's criterion with a confidence level of 95 %;  $\eta^2$  – the strength of the influence of soil type on the density of the stock of raw materials; F – Fisher criterion.

Средняя плотность запасов травы полыни варьирует от  $80,13 \pm 4,81$  кг/га на смытых и намытых до  $142,12 \pm 9,40$  кг/га на аллювиальных дерновых кислых почвах и увеличивается ряду: смытые и намытые < светло-серые лесные < черноземы оподзоленные < дерново-сильноподзолистые и светло-серые лесные < серые лесные < дерново-среднеподзолистые < аллювиальные дерновые кислые.

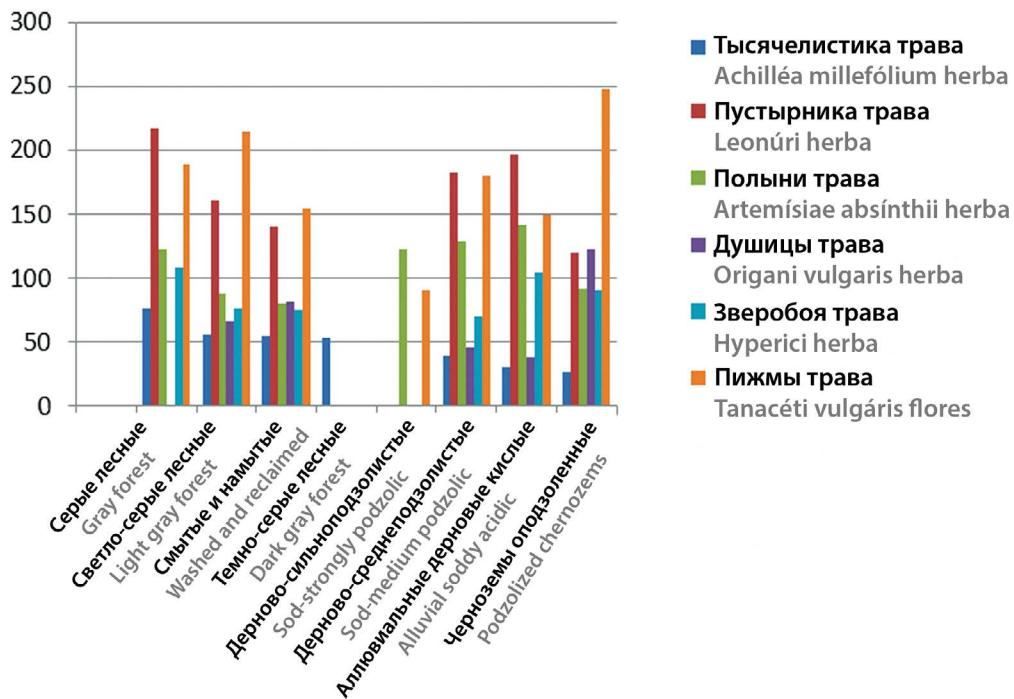
Средняя плотность запасов травы пустырника на обследованной территории варьирует от  $120,03 \pm 18,2$  кг/га на черноземах оподзоленных до  $216,79 \pm 15,70$  кг/га на серых лесных почвах и увеличивается в ряду: черноземы оподзоленные < смытые и намытые < светло-серые лесные < дерново-среднеподзолистые < аллювиальные дерновые кислые < серые лесные.

Средняя плотность запасов травы тысячелистника варьирует от  $26,93 \pm 2,30$  кг/га на черноземах оподзоленных до  $75,90 \pm 5,04$  кг/га на серых лесных почвах и увеличивается в ряду: черноземы оподзоленные < аллювиальные дерновые кислые < дерново-среднеподзолистые < темно-серые лесные < смытые и намытые < светло-серые лесные < серые лесные.

Проведенный сравнительный анализ показал значительное различие плотностей запасов сырья всех исследуемых видов лекарственных растений в зависимости от типов почв (рисунок 3)

Далее был проведен анализ ПЗС в зависимости от региона произрастания и типов почв (таблица 2).

Сравнительный анализ плотности запаса душицы травы в Пермском крае и Свердловской области по типам почв показал, что ПЗС душицы достоверно вы-



**Рисунок 3. Плотность запасов сырья исследуемых видов на различных типах почв, кг/га**

**Figure 3. The density of raw materials stocks of the studied species on different types of soils, kg/ha**

ше на всех типах почв в Свердловской области, кроме смытых и намытых почв.

Сравнительный анализ плотностей запасов зверобоя травы, заготовленной в различных регионах, по типам почв показал, что средняя ПЗС травы зверобоя выше в Свердловской области на всех типах почв, кроме аллювиальных дерновых кислых.

Сравнительный анализ плотностей запасов пижмы цветков в двух регионах по типам почв показал, что средняя ПЗС цветков пижмы в пределах Среднего Урала выше на дерново-среднеподзолистых, свет-

ло-серых лесных и дерново-сильноподзолистых и светло-серых лесных почвах.

Сравнительный анализ плотностей запасов полыни горькой, заготовленной в Пермском крае и Свердловской области, по типам почв показал, что средняя ПЗС полыни горькой в Пермском крае выше на аллювиальных дерновых кислых, дерново-среднеподзолистых и серых лесных почвах по сравнению с Свердловской областью. При этом дисперсионный анализ и *t*-критерий по Стьюденту показывают, что ПЗС в исследованных регионах достоверно не отличаются.

**Таблица 2. Оценка влияния типов почв в различных ботанико-географических зонах на плотность запасов сырья исследуемых видов**

**Table 2. Assessment of the influence of soil types in various botanical and geographical zones on the density of raw materials stocks of the studied species**

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he		<i>t</i> , 95*	$\eta^2$ , F*
		Пермский край Perm' region	Свердловская область Sverdlovsk region		
Влияние типа почв Пермского края и Свердловской области на ПЗС душицы Influence of soil type in the Perm Region and Sverdlovsk Region on the SDM of <i>Origanum vulgare L.</i>					
1	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	37,48 ± 2,02	92,62 ± 9,12	5,90	$\eta^2 = 52,59\%$ $p = 0,03$ $F_{\text{факт.}} = 7,77$ $F_{\text{теор. 0,05}} = 5,59$ $\eta^2 = 52,59\%$ $p = 0,03$ $F_{\text{fact.}} = 7,77$ $F_{\text{theor. 0,05}} = 5,59$

Продолжение таблицы 2

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he		<i>t</i> , 95*	$\eta^2$ , <i>F</i> *
		Пермский край Perm' region	Свердловская область Sverdlovsk region		
2	Дерново-среднеподзолистые Sod-medium podzolic	46,31 ± 11,20	77,20 ± 4,47	<b>2,56</b>	$\eta^2 = 4,13\%$ $p = 0,57$ $F_{факт.} = 0,35$ $F_{теор. 0,05} = 5,32$ $\eta^2 = 4,13\%$ $p = 0,57$ $F_{fact.} = 0,35$ $F_{theor. 0,05} = 5,32$
3	Светло-серые лесные Light gray forest	66,36 ± 6,26	93,40 ± 4,71	<b>3,45</b>	$\eta^2 = 6,69\%$ $p = 0,47$ $F_{факт.} = 0,57$ $F_{теор. 0,05} = 5,32$ $\eta^2 = 6,69\%$ $p = 0,47$ $F_{fact.} = 0,57$ $F_{theor. 0,05} = 5,32$
4	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	81,28 ± 3,90	75,08 ± 2,68	1,31	$\eta^2 = 0,35\%$ $p = 0,77$ $F_{факт.} = 0,088$ $F_{теор. 0,05} = 4,24$ $\eta^2 = 0,35\%$ $p = 0,77$ $F_{fact.} = 0,088$ $F_{theor. 0,05} = 4,24$
<i>Влияние типа почв Пермского края и Свердловской области на ПЗС зверобояев</i> <i>Influence of soil type in the Perm Region and Sverdlovsk Region on the SDM of Hypericum perforatum L., Hypericum maculatum Crantz</i>					
5	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	104,71 ± 8,33	77,89 ± 4,98	<b>2,76</b>	$\eta^2 = 8,45\%$ $p = 0,42$ $F_{факт.} = 0,74$ $F_{теор. 0,05} = 5,32$ $\eta^2 = 8,45\%$ $p = 0,42$ $F_{fact.} = 0,74$ $F_{theor. 0,05} = 5,32$
6	Дерново-сильноподзолистые и светло-серые лесные Sod-strongly podzolic and light gray forest	42,10 ± 5,05	100,20 ± 8,08	<b>6,10</b>	—**
7	Светло-серые лесные Light gray forest	76,19 ± 4,02	115,55 ± 4,27	<b>6,71</b>	$\eta^2 = 10,45\%$ $p = 0,14$ $F_{факт.} = 2,33$ $F_{теор. 0,05} = 4,35$ $\eta^2 = 10,45\%$ $p = 0,14$ $F_{fact.} = 2,33$ $F_{theor. 0,05} = 4,35$
8	Серые лесные Gray forest	108,41 ± 5,86	176,88 ± 9,75	<b>6,02</b>	$\eta^2 = 14,19\%$ $p = 0,20$ $F_{факт.} = 1,82$ $F_{теор. 0,05} = 4,84$ $\eta^2 = 14,19\%$ $p = 0,20$ $F_{fact.} = 1,82$ $F_{theor. 0,05} = 4,84$
9	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	74,72 ± 3,76	96,76 ± 2,62	<b>4,81</b>	$\eta^2 = 2,01\%$ $p = 0,42$ $F_{факт.} = 0,66$ $F_{теор. 0,05} = 4,15$ $\eta^2 = 2,01\%$ $p = 0,42$ $F_{fact.} = 0,66$ $F_{theor. 0,05} = 4,15$

Продолжение таблицы 2

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he		<i>t</i> , 95*	$\eta^2$ , <i>F</i> *
		Пермский край Perm' region	Свердловская область Sverdlovsk region		
<i>Влияние типа почв Пермского края и Свердловской области на ПЗС пижмы</i> <i>Influence of soil type in the Perm Region and Sverdlovsk Region on the SDM of Tanacetum vulgare L.</i>					
10	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	149,41 ± 7,71	225,142 ± 14,20	<b>4,69</b>	$\eta^2 = 10,48\%$ $p = 0,30$ $F_{факт.} = 1,17$ $F_{теор. 0,05} = 4,96$ $\eta^2 = 10,48\%$ $p = 0,30$ $F_{fact.} = 1,17$ $F_{theor. 0,05} = 4,96$
11	Дерново-средне-подзолистые Sod-medium podzolic	180,77 ± 15,36	100,20 ± 8,08	<b>2,39</b>	$\eta^2 = 5,26\%$ $p = 0,55$ $F_{факт.} = 0,39$ $F_{теор. 0,05} = 5,59$ $\eta^2 = 5,26\%$ $p = 0,55$ $F_{fact.} = 0,39$ $F_{theor. 0,05} = 5,59$
12	Светло-серые лесные Light gray forest	214,34 ± 6,23	206,06 ± 15,48	0,50	$\eta^2 = 0,34\%$ $p = 0,87$ $F_{факт.} = 0,03$ $F_{теор. 0,05} = 5,32$ $\eta^2 = 0,34\%$ $p = 0,87$ $F_{fact.} = 0,03$ $F_{theor. 0,05} = 5,32$
13	Серые лесные Gray forest	189,17 ± 8,96	192,43 ± 19,97	0,15	$\eta^2 = 0,12\%$ $p = 0,94$ $F_{факт.} = 0,007$ $F_{теор. 0,05} = 5,99$ $\eta^2 = 0,12\%$ $p = 0,94$ $F_{fact.} = 0,007$ $F_{theor. 0,05} = 5,99$
14	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	154,40 ± 13,79	156,37 ± 6,02	0,13	$\eta^2 = 0,01\%$ $p = 0,97$ $F_{факт.} = 0,002$ $F_{теор. 0,05} = 4,6$ $\eta^2 = 0,01\%$ $p = 0,97$ $F_{fact.} = 0,002$ $F_{theor. 0,05} = 4,6$
15	Дерново-сильно-подзолистые и светло-серые лесные Sod-strongly podzolic and light gray forest	90,20 ± 10,82	86,40 ± 10,37	0,25	—**
<i>Влияние типа почв Пермского края и Свердловской области на ПЗС полыни горькой</i> <i>Influence of soil type in the Perm Region and Sverdlovsk Region on the SDM of Artemisia absinthium L.</i>					
16	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	142,12 ± 9,40	154,85 ± 8,06	1,03	$\eta^2 = 0,28\%$ $p = 0,81$ $F_{факт.} = 0,06$ $F_{теор. 0,05} = 4,3$ $\eta^2 = 0,28\%$ $p = 0,81$ $F_{fact.} = 0,06$ $F_{theor. 0,05} = 4,3$
17	Дерново-средне-подзолистые Sod-medium podzolic	129,30 ± 7,08	107,09 ± 3,78	2,77	$\eta^2 = 2,41\%$ $p = 0,44$ $F_{факт.} = 0,62$ $F_{теор. 0,05} = 4,24$ $\eta^2 = 2,41\%$ $p = 0,44$ $F_{fact.} = 0,62$ $F_{theor. 0,05} = 4,24$

Продолжение таблицы 2

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he		t, 95*	$\eta^2, F^*$
		Пермский край Perm' region	Свердловская область Sverdlovsk region		
18	Светло-серые лесные Light gray forest	87,41 ± 6,33	227,59 ± 12,50	10,01	$\eta^2 = 37,58\%$ $p = 0,06$ $F_{факт.} = 4,82$ $F_{теор. 0,05} = 5,32$ $\eta^2 = 37,58\%$ $p = 0,06$ $F_{fact.} = 4,82$ $F_{theor. 0,05} = 5,32$
19	Серые лесные Gray forest	122,93 ± 7,20	107,68 ± 6,73	1,55	$\eta^2 = 0,83\%$ $p = 0,79$ $F_{факт.} = 0,08$ $F_{теор. 0,05} = 5,12$ $\eta^2 = 0,83\%$ $p = 0,79$ $F_{fact.} = 0,08$ $F_{theor. 0,05} = 5,12$
20	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	80,13 ± 4,81	130,94 ± 3,68	8,39	$\eta^2 = 13,13\%$ $p = 0,058$ $F_{факт.} = 3,93$ $F_{теор. 0,05} = 4,23$ $\eta^2 = 13,13\%$ $p = 0,058$ $F_{fact.} = 3,93$ $F_{theor. 0,05} = 4,23$
<i>Влияние типа почв Пермского края и Свердловской области на ПЗС пустырника пятилопастного</i> <i>Influence of soil type in the Perm Region and Sverdlovsk Region on the SDM of Leonurus quinquelobatus Gilib.</i>					
21	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	197,02 ± 25,20	144,36 ± 6,94	2,01	$\eta^2 = 7,09\%$ $p = 0,43$ $F_{факт.} = 0,69$ $F_{теор. 0,05} = 5,12$ $\eta^2 = 7,09\%$ $p = 0,43$ $F_{fact.} = 0,69$ $F_{theor. 0,05} = 5,12$
22	Дерново-средне-подзолистые Sod-medium podzolic	182,35 ± 17,66	182,62 ± 9,88	0,01	$\eta^2 = 0,0002\%$ $p = 0,99$ $F_{факт.} = 1,4E-05$ $F_{теор. 0,05} = 5,59$ $\eta^2 = 0,0002\%$ $p = 0,99$ $F_{fact.} = 1,4E-05$ $F_{theor. 0,05} = 5,59$
23	Светло-серые лесные Light gray forest	160,71 ± 21,3	101,35 ± 13,9	2,33	—**
<i>Влияние типа почв Пермского края и Свердловской области на ПЗС тысячелистника обыкновенного</i> <i>Influence of soil type in the Perm Region and Sverdlovsk Region on the SDM of Achillea millefolium L.</i>					
24	Аллювиальные дерновые кислые Alluvial soddy acidic	30,10 ± 6,11	37,92 ± 1,48	1,24	$\eta^2 = 2,77\%$ $p = 0,51$ $F_{факт.} = 0,46$ $F_{теор. 0,05} = 4,49$ $\eta^2 = 2,77\%$ $p = 0,51$ $F_{fact.} = 0,46$ $F_{theor. 0,05} = 4,49$
25	Дерново-средне-подзолистые Sod-medium podzolic	39,75 ± 2,27	26,78 ± 1,30	4,94	$\eta^2 = 12,59\%$ $p = 0,11$ $F_{факт.} = 2,88$ $F_{теор. 0,05} = 4,35$ $\eta^2 = 12,59\%$ $p = 0,11$ $F_{fact.} = 2,88$ $F_{theor. 0,05} = 4,35$

Окончание таблицы 2

№	Тип почв Soil type	Средняя ПЗС, кг/га Average stock density, kg/he		$t, 95^*$	$\eta^2, F^*$
		Пермский край Perm' region	Свердловская область Sverdlovsk region		
26	Светло-серые лесные Light gray forest	$56,24 \pm 4,42$	$46,40 \pm 2,68$	1,90	$\eta^2 = 3,22\%$ $p = 0,59$ $F_{\text{факт.}} = 0,29$ $F_{\text{теор.} 0,05} = 5,12$ $\eta^2 = 3,22\%$ $p = 0,59$ $F_{\text{fact.}} = 0,29$ $F_{\text{theor.} 0,05} = 5,12$
27	Серые лесные Gray forest	$41,51 \pm 5,04$	$37,80 \pm 2,73$	0,65	$\eta^2 = 60,34\%$ $p = 0,04$ $F_{\text{факт.}} = 7,61$ $F_{\text{теор.} 0,05} = 6,61$ $\eta^2 = 60,34\%$ $p = 0,04$ $F_{\text{fact.}} = 7,61$ $F_{\text{theor.} 0,05} = 6,61$
28	Смытые и намытые Eroded and reclaimed	$54,24 \pm 2,78$	$40,40 \pm 1,61$	<b>4,30</b>	$\eta^2 = 10,07\%$ $p = 0,16$ $F_{\text{факт.}} = 2,13$ $F_{\text{теор.} 0,05} = 4,38$ $\eta^2 = 10,07\%$ $p = 0,16$ $F_{\text{fact.}} = 2,13$ $F_{\text{theor.} 0,05} = 4,38$
29	Черноземы оподзоленные Podzolized chernozems	$26,93 \pm 2,30$	$29,98 \pm 5,7$	0,50	$\eta^2 = 0,72\%$ $p = 0,89$ $F_{\text{факт.}} = 0,021$ $F_{\text{теор.} 0,05} = 10,13$ $\eta^2 = 0,72\%$ $p = 0,89$ $F_{\text{fact.}} = 0,021$ $F_{\text{theor.} 0,05} = 10,13$

**Примечание.** \*  $t, 95$  – критерий Стьюдента при доверительной вероятности 95 %;  $\eta^2$  – сила влияния типа почв на плотность запаса сырья;  $F$  – критерий Фишера; \*\* – единичные значения.

**Note.** \*  $t, 95$  – Student's criterion with a confidence level of 95 %;  $\eta^2$  – the strength of the influence of soil type on the stock density of raw materials;  $F$  – Fisher criterion; \*\* – single values.

Сравнительный анализ плотностей запасов пустырника травы в регионах исследования показал, что средняя ПЗС пустырника несколько выше в Пермском крае, однако, учитывая схожесть условий обитания данного вида, статистически подтверждено, что тип почв в регионах не оказывает влияния на урожайность сырья.

Сравнительный анализ плотностей запасов тысячелистника травы в регионах исследования по типам почв показал, что ПЗС тысячелистника на дерново-среднеподзолистых, светло-серые лесных, серых лесных и смытых и намытых почвах выше в Пермском крае. Однако, статистически доказано, что эти показатели достоверно не отличаются и влияние типа почв не существенно.

Установлено, что для всех изучаемых видов лекарственных растений наименее перспективными местами потенциальной заготовки являются участки,

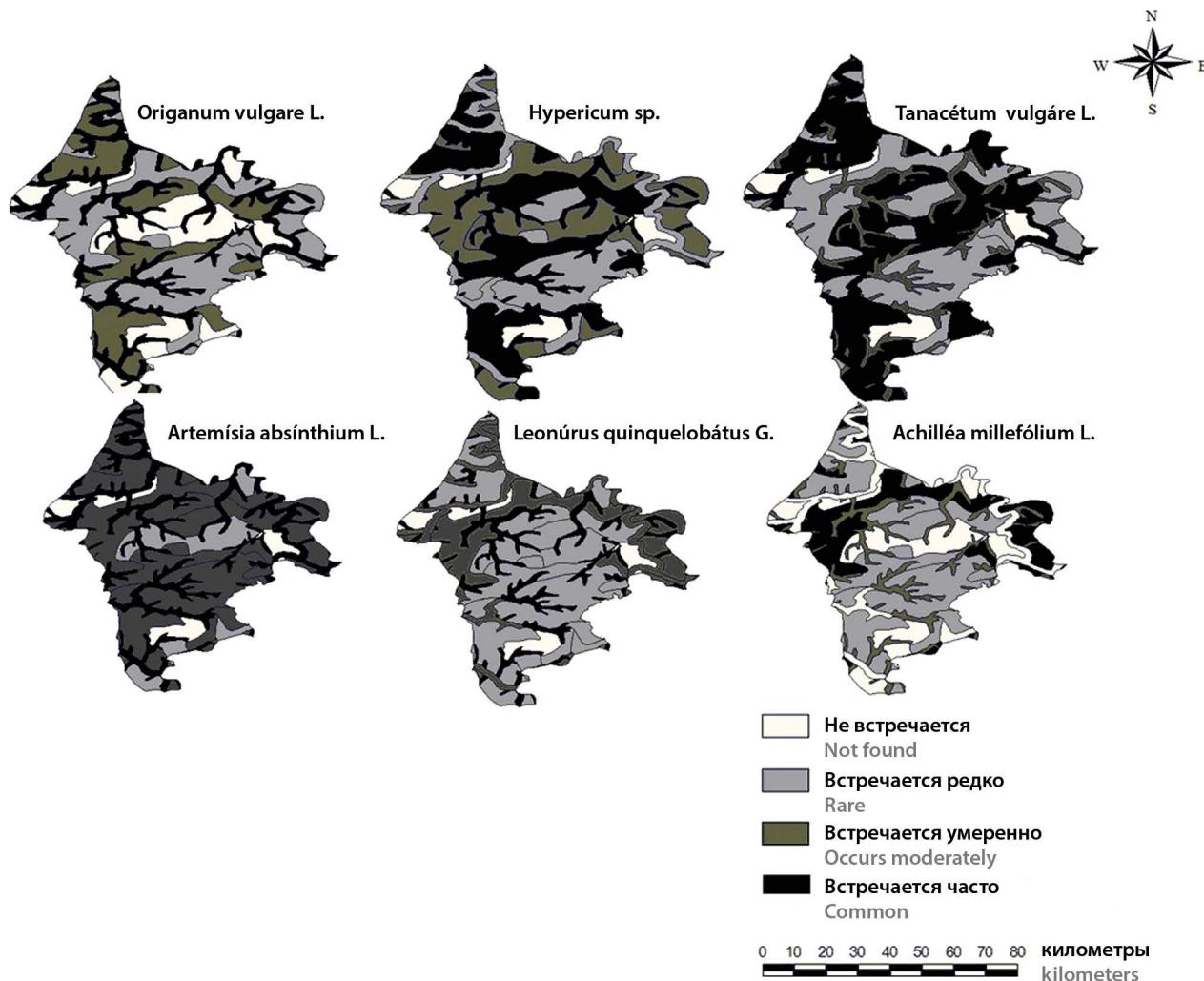
приуроченные к темно-серым лесным почвам. Траву душицы также нерационально заготавливать на участках, приуроченных к серым лесным почвам, а траву тысячелистника – на участках с аллювиальными дерновыми кислыми почвами.

На основании данных по приуроченности ЛР к типам почв нами были созданы прогнозные карты встречаемости лекарственных растений в пределах Среднего Урала (рисунок 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет получить принципиально новый картографический материал, включающий комплект прогнозных карт встречаемости дикорастущих лекарственных растений на примере Среднего Урала.

Предложенный алгоритм работы с геопространственным анализом, выполненный для слоев «экспо-



**Рисунок 4. Прогнозная карта встречаемости исследуемых видов (на примере Кунгурской островной лесостепи)**

**Figure 4. Forecast map of the occurrence of the studied species (on the example of the Kungur island forest-steppe)**

зиция склонов» и «лекарственные растения», может быть использован для нахождения пространственных отношений между любыми практически значимыми слоями. Разработанный принцип построения прогнозных карт применим для любых регионов при наличии соответствующих топооснов.

При наличии достаточного информационного обеспечения (электронные слои), комбинируя слои данных, открывается возможность поиска областей на местности, наиболее пригодных для произрастания интересующих растений, в том числе и требующих охраны.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Верхутуров А. А., Мелкий В. А. Картографирование растительных сообществ подзоны темнохвойных лесов юга Сахалина на основе космических съемок. *Материалы Международной конференции «ИнтерКарто. ИнтерГИС»*. 2020;26(4):60–72. DOI: 10.35595/2414-9179-2020-4-26-60-72.
2. Самофалова И. А. Геомоделирование почвенного покрова на основе обобщенного пространственного анализа территории заповедника «Басеги» (Средний Урал). *Материалы Международной конференции «ИнтерКарто. ИнтерГИС»*. 2020;26(4):131–146. DOI: 10.35595/2414-9179-2020-4-26-131-146.
3. Санданов Д. В. Современные подходы к моделированию разнообразия и пространственному распределению видов растений: перспективы их применения в России. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2019;46:82–114. DOI: 10.17223/19988591/46/5.
4. Тептина А. Ю., Лебедева М. Б., Ямалов С. М. О некоторых сообществах петрофитных степей Среднего Урала. *Растительность России*. 2018;33:92–106. DOI: 10.31111/vegrus/2018.33.92.
5. Турышев А. Ю., Рябинин А. Е. Изучение дикорастущих лекарственных растений с использованием геопространственного анализа (на примере Свердловской области). *Материалы Международной конференции «ИнтерКарто. ИнтерГИС»*. 2015;21(1):139–145.
6. Хасanova Г. Р., Ямалов С. М., Лебедева М. В., Сафин Х. М. Прогноз распространения сорно-полевых сообществ Южного Урала на основе климатического моделирования. *Достижения науки и техники АПК*. 2018;9(32):17–20. DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10904.
7. Абдуллин Р. К., Шихов А. Н., Тарасов А. В. Структура и информационное наполнение электронного атласа изменен-

- ний климата Урала. *Материалы Международной конференции «ИнтерКарто. ИнтерГИС».* 2019;25(2):247–259. DOI: 10.35595/2414-9179-2019-2-25-247-259.
8. Королюк А. Ю., Дулепова Н. А., Ямалов С. М., Лебедева М. В., Голованов Я. М., Зверев А. А. Закономерности организации растительности песчаных степей долин рек Самары, Урала и их притоков (Оренбургская область). *Сибирский экологический журнал.* 2018;11(2):173–182. DOI: 10.1134/S1995425518020051.
9. Шихов А. Н., Перминов С. И., Киселева Е. С. Оценка подверженности бореальных лесов Урала воздействию лесных пожаров и ветровалов по многолетним рядам спутниковых наблюдений. *Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса.* 2017;14(3):87–102. DOI: 10.21046/2070-7401-2017-14-4-87-102.
10. Tretyakova A., Grudanov N., Kondratkov P., Knyazev M. Aquatic vascular plants of the Middle Urals (Sverdlovsk region, Russian Federation). Occurrence dataset Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin». 2019. DOI: 10.15468/xxuhdl. Available at: GBIF.org. Accessed: 21.01.2020.

## REFERENCES

1. Verkhoturov A. A., Melkiy V. A. Mapping of vegetation communities of the subzone of dark coniferous forests of the South Sakhalin based on space surveys. *Proceedings of the International conference “InterCarto. InterGIS”.* 2020;26(4):60–72. (In Russ.) DOI: 10.35595/2414-9179-2020-4-26-60-72.
2. Samofalova I. A. Geomodeling of soil cover on the basis of generalized spatial analysis territories of the “Basegi” Reserve (Middle Ural). *Proceedings of the International conference “InterCarto. InterGIS”.* 2020;26(4):131–146. (In Russ.) DOI: 10.35595/2414-9179-2020-4-26-131-146.
3. Sandanov D. V. Modern approaches to modeling the diversity and spatial distribution of plant species: prospects for their application in Russia. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya.* 2019;46:82–114. (In Russ.) DOI: 10.17223/19988591/46/5.
4. Teptina A. Yu., Lebedeva M. B., Yamalov S. M. About some communities of petrophytic steppes of the Middle Urals. *Rastitel'nost' Rossii.* 2018;33:92–106. (In Russ.) DOI: 10.31111/vegrus/2018.33.92.
5. Turyshev A. Y., Ryabinin A. E. The study of wild medicinal plants using geospatial analysis (for example, Sverdlovsk region). *Proceedings of the International conference “InterCarto. InterGIS”.* 2015;21(1):139–145. (In Russ.).
6. Khasanova G. R., Yamalov S. M., Lebedeva M. V., Safin H. M. Prediction of the distribution of weed-field communities in the Southern Urals based on climate modeling. *Dostizheniya nauki i tekhniki.* 2018;9(32):17–20. (In Russ.) DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10904.
7. Abdullin R. K., Shikhov A. N., Tarasov A. V. Structure and information filling of the digital atlas of climate change of the Ural Region. *Proceedings of the International conference “InterCarto. InterGIS”.* 2019;25(2):247–259. (In Russ.) DOI: 10.35595/2414-9179-2019-2-25-247-259.
8. Korolyuk A. Yu., Dulepova N. A., Yamalov S. M., Lebedeva M. V., Golovanov Ya. M., Zverev A. A. Patterns of Sandy steppe vegetation in the valleys of Samara and Ural Rivers and their tributaries in Orenburg Oblast. *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal.* 2018;11(2):173–182. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1995425518020051.
9. Shikhov A. N., Perminov S. I., Kiselyova E. S. Assessment of boreal forests vulnerability to fire- and wind-induced disturbances from long-term series of satellite observations within the Urals region. *Sovremennie problem distancionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa.* 2017;14(3):87–102. (In Russ.) DOI: 10.21046/2070-7401-2017-14-4-87-102.
10. Tretyakova A., Grudanov N., Kondratkov P., Knyazev M. Aquatic vascular plants of the Middle Urals (Sverdlovsk region, Russian Federation). Occurrence dataset Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin». 2019. DOI: 10.15468/xxuhdl. Available at: GBIF.org. Accessed: 21.01.2020.



**Обзорная статья / Review article**

## **Хелидоновая кислота и ее дериваты: общий спектр биологической активности и остеогенные свойства (обзор)**

**Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, Е. Ю. Авдеева, С. В. Кривошеков<sup>✉</sup>,  
И. А. Хлусов, М. В. Белоусов**

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Кривошеков Сергей Владимирович. E-mail: ksv\_tsu@mail.ru

**ORCID:** Л. А. Мирошниченко – <https://orcid.org/0000-0002-3684-5510>; Т. Ю. Полякова – <https://orcid.org/0000-0003-0971-7844>;  
Е. Ю. Авдеева – <https://orcid.org/0000-0001-7061-9843>; С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; И. А. Хлусов – <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>;  
М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 14.07.2022

Статья принята в печать: 17.11.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### **Резюме**

**Введение.** Разработка и внедрение новых эффективных и безопасных лекарственных средств с остеогенной активностью является актуальной проблемой современной медицинской и фармацевтической наук. Это обусловлено широкой распространностью и сложностью терапии заболеваний опорно-двигательного аппарата, что влечет за собой значительные экономические затраты на лечение и восстановление данной группы пациентов. В последнее время стандартные схемы терапии все больше дополняются препаратами, полученными из лекарственных растений, что связано с их достаточно выраженным терапевтическим воздействием и отсутствием или слабой выраженностью побочных эффектов по сравнению с более дорогими современными медицинскими аналогами. В связи с этим актуальным становится развитие новых направлений в стратегии разработки фармакологических средств из растительных источников. Изучение вторичных метаболитов растений является одной из таких областей, которая уже дала хорошие результаты в отношении разработки лекарств, и имеет большие перспективы. В обзоре представлена информация о биологических свойствах хелидоновой кислоты и возможных ее дериватов, с целью продемонстрировать перспективы применения этих объектов для разработки лекарственных средств, в том числе, с остеогенной активностью.

**Текст.** Хелидоновая кислота является веществом, присутствующим во многих лекарственных растениях, и обладающая широким спектром фармакологических эффектов – обезболивающий, противомикробный, противовоспалительный, онкостатический и седативный. На данный момент разработаны способы получения хелидоновой кислоты и ее дериватов из природных источников. Кроме того, хелидоновая кислота относится к так называемым «малым» молекулам с остеогенными свойствами, что делает ее перспективной в создании препаратов для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата, вызванных нарушением формирования и регенерации костной ткани. Нативная хелидоновая кислота обладает невысокой остеогенной активностью, но учитывая ее способность образовывать комплексные соединения, она может выступать системой доставки остеопротекторных микро- и макроэлементов. Так, хелидонат кальция в экспериментах *in vitro* и *in vivo* проявляет выраженную остеогенную активность: стимулирует жизнеспособность, адгезию и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, усиливает минерализацию внеклеточного матрикса.

**Заключение.** Принимая во внимание широкий спектр биологической активности хелидоновой кислоты, представляется актуальным ее использование в комплексной терапии аллергий, депрессий, сахарного диабета, воспалительных заболеваний, злокачественных новообразований и других патологических состояний. Хелидонат кальция является перспективным лекарственным кандидатом, который можно будет применять для ускорения процессов регенерации и в инженерии костной ткани.

**Ключевые слова:** хелидоновая кислота, хелидонат кальция, производные  $\gamma$ -пирона, остеогенная активность, остеопротекторы

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

**Вклад авторов.** Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова проработали литературные источники, участвовали в написании текста статьи. Е. Ю. Авдеева проработала графический материал, участвовала в написании текста статьи. С. В. Кривошеков проработал литературные источники, участвовал в написании и утверждении текста статьи. И. А. Хлусов, М. В. Белоусов участвовали в написании и утверждении текста статьи.

**Для цитирования:** Мирошниченко Л. А., Полякова Т. Ю., Авдеева Е. Ю., Кривошеков С. В., Хлусов И. А., Белоусов М. В. Хелидоновая кислота и ее дериваты: общий спектр биологической активности и остеогенные свойства. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):60–71. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-60-71>

## **Chelidonic Acid and its Derivates: General Spectrum of Biological Activity and Osteogenic Properties (Review)**

**Larisa A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova, Elena Yu. Avdeeva, Sergei V. Krivoshchekov<sup>✉</sup>,  
Igor A. Khlusov, Mikhail V. Belousov**

Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

<sup>✉</sup> Corresponding author: Sergey V. Krivoshchekov. E-mail: ksv\_tsu@mail.ru

**ORCID:** Larisa A. Miroshnichenko – <https://orcid.org/0000-0002-3684-5510>; Tatiana Yu. Polyakova – <https://orcid.org/0000-0003-0971-7844>;  
Elena Yu. Avdeeva – <https://orcid.org/0000-0001-7061-9843>; Sergei V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;  
Igor A. Khlusov – <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 14.07.2022

Revised: 17.11.2022

Published: 25.11.2022

© Мирошниченко Л. А., Полякова Т. Ю., Авдеева Е. Ю., Кривошеков С. В., Хлусов И. А., Белоусов М. В., 2022  
© Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Avdeeva E. Yu., Krivoshchekov S. V., Khlusov I. A., Belousov M. V., 2022

## Abstract

**Introduction.** The development and implementation of new effective and safe drugs with osteogenic activity is an urgent problem of modern medical and pharmaceutical sciences. This is due to the wide prevalence and complexity of the treatment of diseases of the musculoskeletal system, which entails significant economic costs for the treatment and recovery of this group of patients. Recently, standard therapy regimens are increasingly being supplemented with drugs derived from medicinal plants, which is associated with their rather pronounced therapeutic effect and the absence or mild side effects compared to more expensive modern medical analogues. In this regard, the development of new directions in the strategy for the development of pharmacological agents from plant sources becomes relevant. The study of plant secondary metabolites is one such area that has already yielded good results in relation to the development of such drugs, and holds great promise. The review provides information on the biological properties of chelidonic acid and its possible derivatives in order to demonstrate the prospects for the use of these objects for the development of drugs, including those with osteogenic activity.

**Text.** Chelidonic acid is a substance present in many medicinal plants and has a wide range of pharmacological effects – analgesic, antimicrobial, anti-inflammatory, oncostatic and sedative. At the moment, methods have been developed for obtaining chelidonic acid and its derivatives from natural sources. In addition, chelidonic acid belongs to the so-called "small" molecules with osteogenic properties, which makes it promising in the creation of drugs for the treatment of diseases of the musculoskeletal system caused by impaired formation and regeneration of bone tissue. Native chelidonic acid has a low osteogenic activity, but given its ability to form complex compounds, it can act as a delivery system for osteoprotective micro- and macroelements. So, calcium chelidonate in experiments *in vitro* and *in vivo* shows a pronounced osteogenic activity: it stimulates the viability, adhesion and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, enhances the mineralization of the extracellular matrix.

**Conclusion.** Taking into account the wide range of biological activity of chelidonic acid, its use in the complex therapy of allergies, depression, diabetes mellitus, inflammatory diseases, malignant neoplasms and other pathological conditions seems relevant. Calcium chelidonate is a promising drug candidate that can be used to accelerate regeneration processes and in bone tissue engineering.

**Keywords:** chelidonic acid, calcium chelidonate,  $\gamma$ -pyrones, osteogenic activity, osteoprotectors

**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 A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova worked through literary sources, participated in writing the text of the article. Elena Yu. Avdeeva worked on the graphic material, participated in writing the text of the article. Sergei V. Krivoshchekov worked through literary sources, participated in writing and approving the text of the article. Igor A. Khlusov, Mikhail V. Belousov participated in the writing and approval of the text of the article.

**For citation:** Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Avdeeva E. Yu., Krivoshchekov S. V., Khlusov I. A., Belousov M. V. Chelidonic acid and its derivates: general spectrum of biological activity and osteogenic properties. *Drug development & registration.* 2022;11(4):60–71. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-60-71>

## ВВЕДЕНИЕ

Вопросы регенерации костной ткани в условиях старения населения, роста травматизма и заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОДА), являются глобальной фундаментально-прикладной научной проблемой современной регенеративной медицины. Заболевания ОДА в настоящее время отличаются не только широкой распространностью, разнообразием, но и сложностью лечения. Такие заболевания имеют высокую социальную значимость, так как снижают качество жизни и нередко приводят к инвалидности и смерти. В структуре заболеваний ОДА значительный процент занимают патологии, связанные с нарушением формирования и регенерации костной ткани, а значит возникает необходимость стимулировать процесс остеогенеза. Осложнения хирургического лечения переломов костей (остеомиелит, несрастающиеся переломы, ложные суставы) с использованием имплантатов и эндопротезов, также требуют фармакологической коррекции с помощью остеогенных средств. Применение лекарственных препаратов, стимулирующих остеогенез, чрезвычайно актуально в реконструктивной хирургии при возмещении объемных дефектов при опухолевых пора-

жениях костной ткани. В последнее время вследствие роста травматизма и широкого использования методов металлоостеосинтеза в лечении переломов наблюдается увеличение числа больных с хроническим остеомиелитом [1, 2]. Несмотря на достигнутые успехи в лечении остеомиелита, частота рецидивов достигает 40 %, что сопряжено с необходимостью повторных операций. Последствия заболевания сопровождаются значительными экономическими затратами на лечение и пенсионное обеспечение пациентов. Таким образом, заболевания ОДА являются не только крупной медицинской, но и социально-значимой проблемой.

В клинической медицине для контроля процессов ремоделирования кости при разных патологиях используют бисфосфонаты, деносумаб, кальцитонин, морфогенетические белки кости (BMP) [3] и некоторые другие факторы роста, которые обладают рядом серьезных побочных эффектов, часто нивелирующих пользу от специфической остеогенной активности [4].

В последнее время стандартные схемы терапии все больше дополняются препаратами, полученными из лекарственных растений. Растущий интерес к средствам природного происхождения обусловлен

их достаточно выраженным терапевтическим воздействием и отсутствием или слабой выраженностью побочных эффектов по сравнению с более дорогими современными медицинскими аналогами. В связи с этим актуальным становится развитие новых направлений в стратегии разработки фармакологических средств из растительных источников. Изучение вторичных метаболитов растений является одной из таких областей, которая уже показала хорошие результаты в отношении разработки таких лекарственных средств и имеет большие перспективы. Современные исследования новых молекул с остеогенной активностью также развиваются в области природных соединений [5].

Особый интерес в области разработки остеогенных средств привлекают так называемые «малые» молекулы с остеогенными свойствами, к которым относится и хелидоновая кислота (ХК), содержащаяся в ряде лекарственных растений, которая обладает различными видами биологической активности, в том числе, и остеогенной [6–9].

Способность ХК хелатировать жизненно-важные ионы металлов за счет координационных связей [10] расширяет спектр ее фармакологической активности.

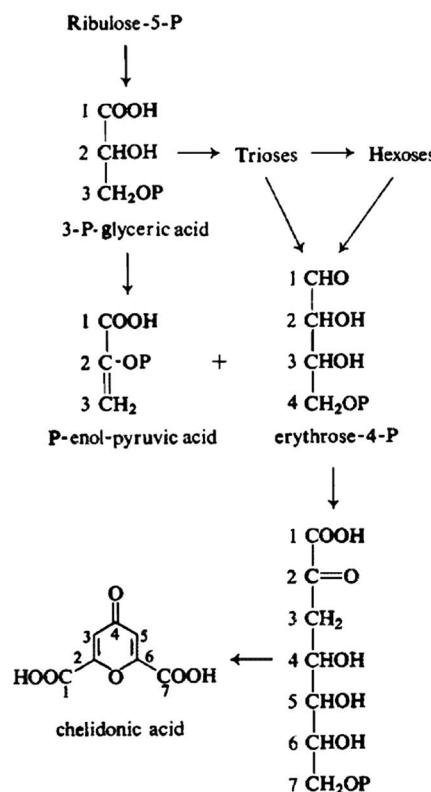
В обзоре обобщены литературные данные по биологической активности хелидоновой кислоты, одному из важнейших природных соединений  $\gamma$ -пиранона, с целью оценки специфической активности и возможности применения в качестве лекарственных средств для стимуляции регенерации костной ткани.

## ИСТОЧНИКИ ХЕЛИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ДЕРИВАТЫ

Впервые хелидоновая кислота (ХК) также известная как 2,6-дикарбокси-4-пиран, 4-оксо-1,4-пиран-2,6-дикарбоновая кислота, 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота, Джерва кислота, Джерваиновая кислота и Джервазиновая кислота [11] выделена в 1839 году из млечного сока стебля чистотела большого (*Chelidonium majus* L.) [12, 13], откуда и получила свое название. ХК представляет собой гетероциклическую органическую кислоту, содержащуюся в более чем 688 видах растений, таких как: плоды марроканской пальмы, цветки ландыша майского, проростки сорго двуцветного и др. [14–17]. Хелидоновая кислота также обнаружена в растениях-продуцентах алкалоидов, где она образует с последними ионные ассоциаты [18]. В тоже время, в качестве вторичного метаболита хелидоновая кислота способна модулировать фармакологическую активность растительных алкалоидов [16].

Первые работы, проводимые в 1960–1970 годах, посвящены изучению процессов, лежащих в основе синтеза данного природного соединения некоторыми видами растений. Показано, что ХК не является продуктом ароматического метаболизма (рисунок 1). Исходя из результатов, полученных при изучении встраивания радиоактивных молекул глюкозы и рибозы в молекулу ХК, биосинтез кислоты может идти

по углеводному пути. На основе данных исследований в качестве строительных блоков  $\gamma$ -пиранона предложены трехуглеродная и четырехуглеродная единицы, образующиеся в результате фотосинтетического восстановительного цикла [19, 20].



**Рисунок 1.** Схема биосинтеза хелидоновой кислоты по Малькольму [20]

**Figure 1.** Scheme of the biosynthesis of chelidonic acid by Malcolm [20]

Позднее появились исследования, касающиеся роли ХК и ее производных в обеспечении процессов жизнедеятельности растительных организмов. Так, было обнаружено, что хелидонат калия отвечает за никтинасты (циркадные движения листьев) у некоторых растений. В частности, было обнаружено, что он регулирует закрытие листьев *Cassia mimosoides* с наступлением темноты [21].

Но даже в работах начала XXI века полный путь метаболизма ХК остается до конца неясным. Выяснение биосинтеза хелидоновой кислоты существенно затруднено вследствие присущей молекуле симметрии [22, 23]. Однако ряд исследователей, используя ретробиосинтетический подход на клеточных супензиях культур *Leucojum aestivum*, установили, что углеродный скелет хелидоновой кислоты собран из одной молекулы пентозы и фосфоенолпирувата [22].

Синтез ХК возможен и в растениях – гиперакумуляторах металлов, накапливающих органические

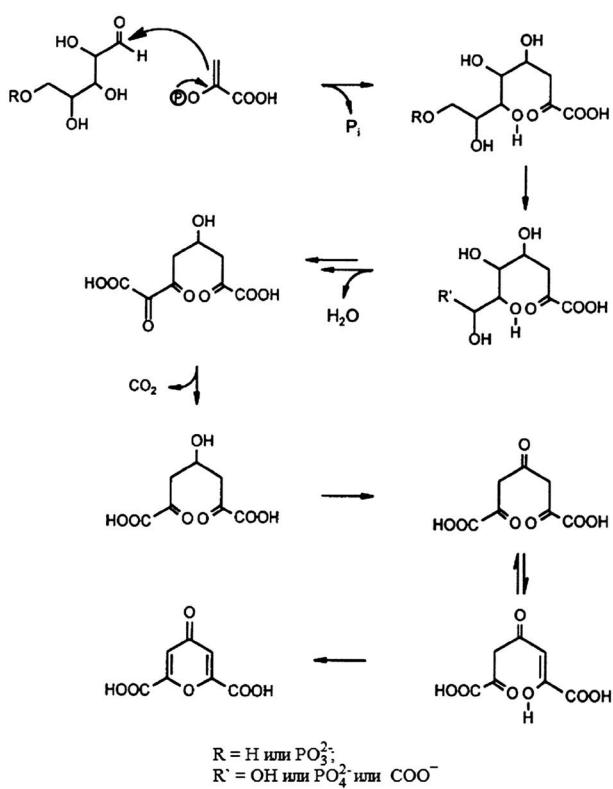


Рисунок 2. Схема биосинтеза хелидоновой кислоты по Уеда [22]

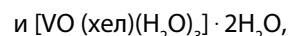
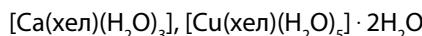
Figure 2. Scheme of the biosynthesis of chelidonic acid by Ueda [22]

кислоты и аминокислоты (в качестве лигандов) в ответ на возрастающее поступление металлов. Так, в исследованиях Chrisanne Naicker показано, что *Berkheya coddii* при воздействии на нее раствором с высокой концентрацией никеля усиливает синтез ХК более чем в 3 раза по сравнению с контролем. Это возможно является ответом растения на стресс-реакцию, связанную с увеличением содержания никеля, что приводит к активации синтеза ХК для связывания избыточного Ni. Основываясь на данных результатах, можно сделать вывод, что ХК фактически является лигандом, ответственным за комплексообразование с Ni в *Berkheya coddii* [23].

Данное свойство ХК, а именно способность хелатировать ионы металлов за счет координационных связей [10], позволило за последние несколько десятилетий синтезировать и зарегистрировать различные комплексы хелидоновой кислоты и следующих металлов – бария, цинка, меди, редкоземельных элементов, никеля и др. [10, 24–28]. Данные металлокомплексы структурно охарактеризованы, а для некоторых из них также исследована биологическая активность [30–41]. Например, металлоорганическое соединение рутения (II), содержащее хелидонатный лиганд, оказалось более токсичным против некоторых микроорганизмов, чем его исходный лиганд, и при этом обладало антиоксидантными свойствами [40, 42].

Также имеется информация о молекулярных и супрамолекулярных структурах пяти металлокомплексов, синтезированных из 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты, а именно тетрааквабериллия 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоксилата (I), гидразиний(2+) диаква(4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоксилата)кальций (II), тетрааква(4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоксилата)марганец(II) дигидрат (III), тетрааква(4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоксилата) меди (II) (IV) и диаква(4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоксилата) моногидрат кадмия (V). Комpleксы (I), (III) и (V) получены прямым взаимодействием в водном растворе 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты с тетрагидратом сульфата бериллия, ацетатом марганца (II) и нитратом кадмия, соответственно. Комплекс (IV) синтезирован аналогичным способом с использованием основного карбоната меди. Анионный комплекс (II) был получен также с помощью данной реакции, но в однократно перегнанной воде, где предположительно остается кальциевый компонент. Полученные данные также указывают на отличную координационную универсальность ХК как лиганда и, как следствие, возможность участвовать в образовании разнообразных структурных комплексов [10].

Несколько новых металлокомплексов хелидоновой кислоты (хелH<sub>2</sub>), а именно



были получены и идентифицированы элементным анализом, охарактеризованы электрохимическими методами и ИК-спектроскопией, а их термическая стабильность исследована методом ТГА/ДТА. Механизм электрохимического восстановления ХК на статическом ртутно-капельном-электроде (СРК-электрод) исследован методом циклической прямоугольной вольтамперометрии при различных значениях pH. Ее восстановление на СРК – электроде является кинетически контролируемой электродной реакцией, протекающей с переносом одного электрона и двух протонов при  $1 < \text{pH} < 6$ , тогда как в сильно щелочных средах перенос электрона не зависит от pH [42].

Также был разработан улучшенный синтез биологически активного диэтил-4-оксо-4Н-пиран-2,5-дикарбоксилата (диэтилизохелидоната), который включает конденсацию этил-2-(диметиламино)метилен-3-оксо-бутаноата с диэтилоксалатом в присутствии гидрида натрия. Данный метод имеет несколько преимуществ, основными из которых являются простота, эффективность и доступность исходных материалов. Из диэтилизохелидоната впервые с хорошим выходом получены изохелидоновая кислота и ее производные. Принимая во внимание данный факт, а именно способность превращать сложноэфирную группу в другие функциональные группы, еще раз подтверждено, что ядро 4-пиран-2,5-дикарбоксилата является уни-

версальным «строительным блоком» для создания широкого спектра производных 4-пирона [9].

При этом растущий интерес к ХК обусловлен не только ее использованием в промышленности в качестве лиганда в металло-органических соединений для их разделения, но и возможностью ХК оказывать широкий спектр фармакологических эффектов, а именно – обезболивающее, противомикробное, противовоспалительное, онкостатическое и седативное действия [9, 17, 48–51].

## ОБЩИЙ СПЕКТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

### Антидепрессивные свойства хелидоновой кислоты

Изучение антидепрессивных свойств ХК в тесте «принудительное плавание» и «открытое поле» показало, что введение перорально кислоты мышам 1 раз в сутки в течение 14 дней приводило к достоверному уменьшению времени неподвижности в teste принудительного плавания без изменения двигательной активности в teste «открытое поле». Кроме того, наблюдалось увеличение количества телец Нисселя в гиппокампе, экспрессии нейротрофического фактора головного мозга и мРНК рецептора эстрогена- $\beta$  на фоне активации фосфорилирования протеинкиназы ERK [52].

### Противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства хелидоновой кислоты

Противовоспалительные свойства ХК характеризовались снижением уровня гиппокампального ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  на фоне значительного повышения уровня серотонина, дофамина и норэpineфрина по сравнению с таковыми у мышей, которым вводили дистиллированную воду [52].

Противовоспалительные свойства ХК также выявлены на модели язвенного колита, индуцированного декстррансульфатом натрия. Введение кислоты ослабляло проявление клинических признаков воспаления кишечника (потеря массы тела и укорочение длины толстой кишки). Кроме того, было обнаружено, что ХК регулирует уровни ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  в сыворотке, а в тканях толстой кишки продукцию простагландин- $E_2$  (PGE2) и уровни экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и индуцированного гипоксией фактора-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), нивелируя их увеличение [51]. Значительное снижение уровня ФНО- $\alpha$  также наблюдалось на модели воспаления пероральных кератиноцитов, культивированных в течение 24 часов с 5 % экстрактом сигаретного дыма и обработанных Kouyanqing Granule, в состав которых в качестве одного из биологически активных ингредиентов входит ХК [53]. Рецидивирующие афтозные язвы, мукоцит полости рта, красный плоский лишай полости рта и другие воспалительные

нарушения в полости рта обычно связаны с секрецией различных провоспалительных цитокинов (например, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и т. д.) [54–57]. Таким образом, модуляция продукции данных цитокинов ХК может способствовать восстановлению слизистой оболочки при воспалительных заболеваниях полости рта.

Hyun-Ji Shin с соавторами исследовали влияние ХК на механизмы регуляции воспалительного ответа, опосредованного тучными клетками линии НМС-1, с помощью форболового эфира  $C_{36}H_{56}O_8$  (форбол-12-миристат-13-ацетат) и ионофора кальция A23187 [50]. Показано, что кислота ингибитирует продукцию ИЛ-6 и экспрессию мРНК ИЛ-6 за счет блокировки ядерного фактора NF-кБ. Хелидоновая кислота уменьшала воспалительные реакции также за счет подавления активации и экспрессии каспазы-1, что также подтверждается данными, полученными Hyun-A Oh с коллегами, на модели аллергического ринита у мышей, сенсибилизованных овальбумином. Пероральное введение ХК значительно уменьшило количество потираний носа/ушей у мышей с аллергическим ринитом за счет снижения уровня гистамина, IgE, уменьшения инфильтрации эозинофилами и тучными клетками. Снижение уровня ИЛ-4 сопровождалось значительным повышением уровня ИФН- $\gamma$ , что позволяет сделать предположение о влиянии ХК в направлении клеточного звена иммунного ответа [58].

Иммуномодулирующие эффекты ХК подтверждены в исследованиях на крысах, иммунизированных овальбумином. ХК вводили животным внутрибрюшинно в дозах 1, 3 и 10 мг/кг. В экспериментах *ex vivo* и *in vitro* показано, что ХК ингибирует дегрануляцию тучных клеток, вызванную овальбумином, и высвобождение гистамина независимо от иммунологических или иных механизмов, участвующих в таком высвобождении. Кроме того, наблюдалось дозозависимое снижение количества эозинофилов и уровня IgE в крови после введения ХК [59]. В связи с этим можно предположить, что иммуномодулирующие реакции ХК на аллергические агенты (овальбумин), зависели от уровня IgE и были опосредованы Th2 клетками. Следует отметить, что указанные эффекты исследуемого препарата оказались сопоставимы с эффектами преднизолона. При этом применение ХК снижало на 40 % гибель животных от анафилактического шока, вызванного введением преднизолона. Кроме того, 14-дневное введение ХК в дозе до 20 мг/кг не вызывало признаков острой токсичности.

В классических тестах по оценке гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета показано, что исследуемое вещество ингибирует у мышей анти-телеопосредованный ответ на введение эритроцитов барана, а также снижает количество клеток, образующих селезеночные бляшки. Кроме того, специфический уровень IgG также снижался на фоне введения ХК по сравнению с контрольным (без лечения ХК). В тоже время в тестах на гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), ХК вызывала снижение реакции

ГЗТ по сравнению с контрольной группой, что предположительно свидетельствует о подавлении клеточно-опосредованного иммунитета исследуемым препаратом. Однако эти эффекты не зависели от дозы XK и могли быть связаны с неспецифическим характером иммунного ответа [59]. Эти результаты свидетельствуют о том, что XK оказывает иммунодепрессивное действие в тестах на адаптивный иммунитет, что может подчеркнуть ее модулирующее воздействие и при других иммуноопосредованных расстройствах.

Полученные данные подтверждают значительные иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства хелидоновой кислоты в экспериментальных моделях аллергии и предполагают возможность использования данной молекулы растительного происхождения в терапии аллергических и противовоспалительных заболеваний.

### Ингибирующее действие хелидоновой кислоты

В исследованиях T. G. Porter и D. L. Martin показано, что XK является мощным ингибитором глутаматдегидрогеназы. Кинетический анализ ингибирования XK выявил, что это соединение было конкурентоспособным с глутаматом со значением  $K_i$  1,2 мкМ, она ингибирала глутамат-зависимое образование апофермента за счет блокирования проникновения глутамата в активный центр фермента, но при этом не влияла на поглощение свободного пиридоксальфосфата. Таким образом, XK может рассматриваться как потенциальный агент, участвующий в регуляции синтеза гамма-аминомасляной кислоты [60].

XK также является ингибитором дигидродипиколинатсинтазы, ключевого фермента биосинтеза лизина через аминопимелатный путь [61].

Имеются данные о возможности использования производных XK в качестве ингибитора BACE1 ( $\beta$ -секретаза, белок-предшественник амилоида). Группой авторов синтезированы непептидные и малоразмерные ингибиторы BACE1, имеющие хелидоновый или 2,6-пиридинкарбоновый гетероциклический каркас в положении P2, которые по проницаемости через гематоэнцефалический барьер сравнимы с мощными пентапептидными ингибиторами BACE1, но обладают гораздо лучшей биодоступностью благодаря высокой ферментативной стабильности [62].

### Противоопухолевые эффекты хелидоновой кислоты

Исследование антиканцерогенных свойств оловоорганических полизифиров XK обусловлено имеющимися данными о противоопухолевых эффектах оловоорганических соединений [63–65], а также о высокой биологической активности XK. Оловоорганические полизиферы XK получены в результате межфазной реакции между динатриевой солью хелидоновой кислоты и различными оловоорганическими дигалогенидами. Токсичность каждого тестируемого

соединения оценивали на клеточной линии аденокарциномы поджелудочной железы человека (AsPC-1) и клеточной линии эпителиоидной протоковой карциномы поджелудочной железы человека (PANC-1). Показано, что оловоорганические полимеры XK более значительно ингибируют рост раковых клеток поджелудочной железы в сравнении с мономерными оловоорганическими фрагментами. Аналогичные результаты получены и при сопоставлении с цисплатином. Возможно, это связано как с полимерной природой материалов, так и с возможностью оловоорганических соединений тормозить рост раковых клеток сразу на нескольких этапах, тогда как цитостатик действует только через хелатирование самой ДНК [11]. Полученные данные безусловно позволят продвинуться в вопросе расширения арсенала противораковых средств.

### Антидиабетические свойства хелидоновой кислоты

Согласно литературным данным, у крыс с сахарным диабетом, индуцированным стрептозотоцином, введение метанольного экстракта *T. cannabina* приводило к снижению уровня глюкозы в крови [66]. Полученная информация позволила предположить наличие гипогликемического действия у эфира пирана (бис-(6-метилгептиловый) эфир 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты), выделенного из хлороформного экстракта корня *T. cannabina*, путем колоночной хроматографии. На модели оплодотворенных яиц цыплят белого леггорна, обработанных стрептозотоцином, показано, что введение данного соединения в дозах 0,5 мг/яйцо и 1 мг/яйцо оказывало дозозависимое антигипергликемическое действие. Сложный эфир пирана в докинг-анализе показал хорошую связывающую способность с активным центром АМФ-киназы, сопоставимую с метформином. Результаты, полученные в исследованиях *in silico*, продемонстрировали дозозависимую эффективность и корреляцию с экспериментами *in vitro*. Однако для полной оценки антидиабетических эффектов данного вещества необходимы дополнительные исследования *in vivo*, а также глубокое изучение биологической безопасности и клинической эффективности [67].

Экспериментально выявлена выраженная анальгезирующая активность производных  $\gamma$ -пиранов, в том числе XK [68–71].

В том числе XK представляет интерес и как лиганд металло-органических соединений в растениях [10, 29], и возможный способ доставки жизненно-важных элементов к органам-мишеням.

### Остеогенная активность хелидоновой кислоты *in vivo* и *in vitro*

В серии экспериментов впервые получены данные об остеогенной активности XK, выделенной из *Saussurea controversa* как в нативном состоянии, так и в комплексе с кальцием  $[\text{Ca}(\text{Cha})(\text{H}_2\text{O})_3]$ , а также

синтезированного *н*-монообутилового эфира хелидоновой кислоты и хелидоната кальция, полученного полусинтетически с использованием природной ХК [72, 73].

Согласно результатам тестирования стромальных клеток *in vitro*, ХК и *н*-монообутиловый эфир ХК показали невысокую активность относительно остеогенной дифференцировки культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека (ЧММСК-ЖТ). При этом высокие дозы данных веществ проявляли цитотоксичность и снижали количество клеток в культуре, зависящее от баланса процессов клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. В свою очередь, исследуемые дозы природного хелидоната кальция значительно стимулировали уровень жизнеспособности клеток, усиливали дифференцировку ЧММСК-ЖТ в остеобласты и минерализацию культуры ЧММСК-ЖТ по сравнению как с контролем, так и с препаратами сравнения. Имеются данные, свидетельствующие о том, что фракция экстракта *S. controversa*, содержащая хелидонат кальция, проявляла остеогенную активность *in vivo* при экспериментальном остеомиелите у крыс (таблица 1) [74, 75].

Рентгеноструктурный анализ продемонстрировал идентичность структуры полусинтетического хелидоната кальция и образца, выделенного из природного сырья [72]. Остеогенную активность полусинтетического хелидоната кальция изучали *in vitro* на 21-дневной культуре ЧММСК-ЖТ и *in vivo* на мышах с помощью эктопической (подкожной) имплантации титановых пластин, покрытых СаСР, насыщенных *in vitro* сингенным костным мозгом. При использовании водного раствора хелидоната кальция в дозе 10 мг/кг происходило усиление минерализации внеклеточного матрикса *in vitro* и формирование эктопической костной ткани *in situ*. Тестируемое вещество способствовало дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стromальных/стволовых клеток жировой ткани человека, а также мезенхимальных стволовых клеток мыши в остеобlastы *in vitro* и *in vivo* соответственно (таблица 1) [73].

Полученные результаты позволили авторам предложить потенциальные мишени для хелидоната кальция. Это могут быть костный морфогенетический белок 2 (BMP-2), фактор транскрипции 2 (RUNX2) и Wnt-путь [76], а также малые остеогенные молекулы, такие как  $\beta$ -глицерофосфат, дексаметазон и аскорбиновая кислота; аденоzin [через ось фосфат-адено-зинтрифосфат (АТФ) – аденоzinовый рецептор A2b (A2bR)] и производное гелиоксантина 4-(4-метокси-фенил)-пиридо[40,30:4,5]тиено-[2,3-*b*]пиридин-2-карбоксамид [77] или кальция (через  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный рецептор). Учитывая все вышеизложенное, а также не токсичность кальциевой соли ХК, авторы считают, что хелидонат кальция является перспективным веществом для ускорения процессов регенерации и инженерии костной ткани.

Таким образом, несмотря на невысокую остеогенную активность нативной ХК, но учитывая ее способность образовывать хелатные соединения, она может выступать системой доставки остеопротекторных микроэлементов, таких как кальций, магний, стронций, оказывающие значительное влияние на процессы регенерации костной ткани и на нормальную структуру кости [78–81].

Необходимо отметить, что поиск систем доставки и нацеливания терапевтических агентов на костную ткань является важной проблемой [82–84]. При этом известно, что органические молекулы с хелатирующими свойствами, в том числе и ХК, могут быть способом доставки минеральных компонентов к тканям и приводить к повышению селективности их терапевтического воздействия на костную ткань [85].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая литературные данные, можно сделать заключение, что дальнейшее проведение поисковых и доклинических фармакологических исследований специфической активности хелидоновой кислоты и ее соединений, поиск мишени их фармакологического воздействия, а также возможность использования хелидоновой кислоты в комплексной терапии заболеваний опорно-двигательного аппарата, аллергий, депрессий, сахарного диабета, воспалительных заболеваний, злокачественных новообразований и других патологических состояний является весьма перспективным. При этом значительный интерес представляет не только изучение природных комплексных соединений хелидоновой кислоты, но и возможность синтеза веществ-кандидатов на ее основе в качестве перспективных остеопротекторов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Батаков Е. А., Алексеев Д. Г., Батаков В. Е. Современные аспекты диагностики и лечения хронического остеомиелита. Самара: Медицина; 2008. 117 с.
2. Ежов И. Ю., Корыткин А. А., Бобров М. И., Загревков В. И., Шебашев А. В. Проблема гнойно-некротических и ранних гнойно-септических осложнений при эндопротезировании тазобедренного сустава. *Вестник национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова*. 2010;5(1):22–25.
3. Kofron M. D., Laurencin C. T. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006;58:555–576. DOI: 10.1016/j.addr.2006.03.008.
4. James A. W., LaChaud G., Shen J., Asatrian G., Nguyen V., Zhang X., Ting K., Soo C. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2016;22:284–297. DOI: 10.1089/ten.TEB.2015.0357.
5. Horcajada M. N., Offord E. Naturally Plant-Derived Compounds: Role in Bone Anabolism. *Current Molecular Pharmacology*. 2012;5(2):205–218. DOI: 10.2174/1874467211205020205.
6. Cavalieri L. F. The chemistry of the monocyclic alpha- and gamma-pyrone Chem. Rev. 1947;41(3):525–84. DOI: 10.1021/cr60130a004.
7. Leopold A. C., Scott F. I., Klein W. H., Ramstad E. Chelidonic acid and its effects on plant growth. *Physiologia Plantarum*. 1952;5:85–90. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1952.tb08232.x.
8. Quin L. D., Tyrell J. A. Fundamentals of Heterocyclic Chemistry: Importance in Nature and in the Synthesis of Pharmaceuticals. John & Wiley Sons: New York; 2010. 327 p.

**Таблица 1. Остеогенная активность хелидоновой кислоты и ее производных in vivo и in vitro**

**Table 1. Osteogenic activity of chelidonic acid and its derivatives in vivo and in vitro**

Вещество Substance	Способ получения Production method	Остеогенная активность Osteogenic activity		Ссылки References
		in vitro	in vivo	
Хелидоновая кислота Chelidonic acid	Природный источник Natural source	Слабый активатор остеогенной дифференцировки культуры чММСК-ЖТ. Цитотоксична в высоких дозах Weak activator of osteogenic differentiation of hAMMSC culture. Cytotoxin in high doses		[72]
Хелидонат кальция Calcium chelidonate	Природный источник Natural source	Стимуляция жизнеспособности клеток, усиление дифференцировки чММСК-ЖТ в остеобласти и минерализации культуры чММСК-ЖТ Stimulation of cell viability, enhancement of hAMMSC differentiation into osteoblasts and mineralization of hAMMSC culture	Остеогенная активность при экспериментальном остеомиелите у крыс Osteogenic activity in experimental osteomyelitis in rats	[72, 74, 75]
n-монобутиловый эфир хелидоновой кислоты n-monobutyl ester of chelidonic acid	Полусинтетический Semi-synthetic	Слабый активатор остеогенной дифференцировки культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека. Цитотоксичен в высоких дозах Weak activator of osteogenic differentiation of hAMMSC culture. Cytotoxin in high doses		[72]
Хелидонат кальция Calcium chelidonate	Полусинтетический Semi-synthetic	Усиление минерализации внеклеточного матрикса и остеогенной дифференцировки чММСК-ЖТ. Нетоксичен Increased mineralization of the extracellular matrix and osteogenic differentiation of hAMMSC	Усиление жизнеспособности, адгезии и остеогенной дифференцировки МСК на поверхности имплантатов, покрытых СаСР, при биомеханических циклических нагрузках, вызванных движением мышц и кожи у мышей. Enhancement of viability, adhesion and osteogenic differentiation of MSCs on the surface of CaP-coated implants under biomechanical cyclic loads caused by movement of muscles and skin in mice.	[73]

9. Obydennov D. L., Rschenthaler G.-V., Sosnovskikh V. Ya. An improved synthesis and some reactions of diethyl 4-oxo-4H-pyran-2,5-dicarboxylate. *Tetrahedron Letters*. 2013;54:6545–6548. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.09.100.
10. Yasodha V., Govindarajan S., Low J. N., Glidewell C. Cationic, neutral and anionic metal(II) complexes derived from 4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylic acid (chelidonic acid). *Acta Crystallogr C*. 2007;63(5):207–215. DOI: 10.1107/S010827010701459X.
11. Carragher C. E., Ayoub M., Ronerb M. R., Moricb A., Trang N. T. Synthesis, structural characterization, and ability to inhibit the growth of pancreatic cancer by organotin polymers containing chelidonic acid. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*. 2013;1(1):65–73. DOI: 10.1080/22243682.2013.774522.
12. Probst, Dzhozef M. A. Beschreibung und Darstellungsweise einiger bei der Analyse des Chelidonium majus aufgefundenen Stoffe. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1839;29(2):113–131. DOI: 10.1002/JLAC.18390290202.
13. Lerch, Udo J., der Chelidonsäure U. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1846;57:273–318.
14. Wayne A. Bough, J. E. Gander Isolation and characterization of chelidonic acid from *Sorghum Vulgarit*. *Phytochemistry*. 1972;11:209–213. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)89991-4.
15. Roberts M. F., Wink M. Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. New York: Springer; 1998. P. 1–7. DOI: 10.1007/978-1-4757-2905-4\_1.
16. Singh Dh. K., Gulati K., Ray A. Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats. *Int Immunopharmacol*. 2016;40:229–234. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.009.
17. Хусаинова А. Ф. Применение физико-химических методов анализа для определения хелидоновой кислоты. Химия и химическая технология в XXI веке. В сб.: XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых учёных. 20–23 мая 2019. Томск: Изд-во ТПУ; 2019. С. 288–289.
18. Ramstadi E. The presence and distribution of chelidonic acid in some plant families. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*. 1953;28(2–3):45–57.
19. Bruce L., Bohm A. Biosynthesis of Chelidonic Acid I. Preliminary Observation on the Precursors of Chelidonic Acid in *Convallaria majalis L.* *Archives of biochemistry and biophysics*. 1966;115:181–186. DOI: 10.1016/s0003-9861(66)81054-8.
20. Malcolm M. J., Gear J. R. The biosynthesis of chelidonic acid Can. *J. Biochem*. 1971;49:412–416. DOI: 10.1139/o71-060.
21. Ueda M., Ohnuki T., Yamamura S. Leaf-opening substance of a nyctinastic plant, *Cassia mimosoides*. *Phytochemistry*. 1998;49:633–635. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00134-4.
22. Shen Z-W., Fisinger U., Poule A., Eisenreich W., Werner I., Pleiner E., Bacher A., Zenk M. H. Tracer studies with 13C-labeled carbohydrates in cultured plant cells. Retrobiosynthetic analysis of chelidonic acid biosynthesis. *Phytochemistry*. 2001;57(1):33–42. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00496-9.

23. Naicker Ch. Identification and quantification of chelidonic acid and other ligands with potential for Ni uptake in the hyperaccumulator, Berkheya coddii. [Dissertation]. Westville, Durban: University of KwaZulu-Natal; 2014.
24. Yasodha V., Govindarajan S., Starosta W., Leciejewicz J. New metal-organic framework solids built from barium and isoelectronic chelidamic and chelidonic acids. *J Chem Crystallography*. 2011;41:1988–1997. DOI: 10.1007/s10870-011-0194-4.
25. Lago A., Carballo R., Fernandez-Hermida N., Rodriguez-Hermida S., Vazquez-Lopez E. Coordination polymers with chelidonate (4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylate) anions and dmso:  $[Zn(chel)(dmso)_2]$  and linkage isomers of  $[Co(chel)(dmso)(H_2O)_3] \cdot H_2O$ . *Journal of Molecular Structure*. 2011;1003(1–3):121–128. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2011.07.050.
26. Fainerman-Melnikova M., Clegg J., Pakchung A., Jensen P., Codd R. Structural diversity of complexes between Cu(II) or Ni(II) and endocyclic oxygen- or nitrogen-containing ligands: synthesis, x-ray structure determinations and circular dichroism spectra. *Cryst Eng Comm*. 2010;12:4217–4225. DOI: 10.1039/C0CE00323A.
27. Zhang Z., Zhang S., Li Y., Niu Z., Shi W., Cheng P. Systematic investigation of the lanthanide coordination polymers with 4H-pyran-2,6-dicarboxylic acid. *Cryst Eng Comm*. 2010;12:1809–1815. DOI: 10.1039/B919056B.
28. Carballo R., Covel B., Fernandez-Hermida N., Vazquez-Lopez E. Synthesis and structures of two one-dimensional coordination polymers:  $[Co(NCS)_2(dpds)_2]$  and  $[Cu(Ox)_2lm]_2$ . *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*. 2007;633(11–12):1787–1790. DOI: 10.1002/zaac.200700123.
29. Belian M. F., Silva W. E., de Sá G. F., Alves S., de Farias R. F. Synthesis and Characterization of Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Complexes With 2,6-Pyridinedicarboxilic Acid, Chelidamic Acid, and Chelidonic Acid. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*. 2014;44(10):1461–1463. DOI: 10.1080/15533174.2013.809754.
30. Manojlovic-Muir L., Muir K. W., Campbell R. A., Mckendrick J. E., Robins D. J. Pentaaqua(chelidonato-O4)copper(II) monohydrate. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 1999;55(2):178–180. DOI: 10.1107/S0108270198011895.
31. Ng S. W., Raj S. S. S., Fun H.-K., Razak I. A., Hook J. M. Linear chains in polymeric dicyclohexylammonium tributyl(4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylato)stannate and methylphenylammonium tributyl(pyridine-2,6-dicarboxylato)stannate containing trigonal bipyramidal tin. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 2000;56(8):966–968. DOI: 10.1107/S0108270100008106.
32. Fainerman-Melnikova M., Clegg J. K., Codd R., Yashoda V., Govindarajan S., Low J. N., Glidewell C., Aqua[bis(2-pyridylmeth-yl)amine][chelidonato(1.5-)]copper(II) chelidonate(0.5-) monohydrate. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*. 2006;62(12):m3582–m3584. DOI: 10.1107/S1600536806050677.
33. Yashoda V., Govindarajan S., Manivannan V., Büyükgünör O. Hexaaquanickel(II) chelidionate monohydrate. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*. 2007;63(11):m2720. DOI: 10.1107/S1600536807049045.
34. Eubank J. F., Kravtsov V. Ch., Eddaoudi M. Synthesis of organic photodimeric cage molecules based on cycloaddition via metal-ligand directed assembly. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(18):5820–5821. DOI: 10.1021/ja070924n.
35. Zhou X.-X., Liu M.-S., Lin X.-M., Fang H.-C., Chen J.-Q., Yang D.-Q., Cai Y.-P. Construction of three low dimensional ZN(II) complexes based on different organic-carboxylic acids. *Inorg. Chim. Acta*. 2009;362:1441–1447. DOI: 10.1016/j.ica.2008.07.015.
36. Zhang Z.-J., Shi W., Huang Y.-Q., Zhao B., Cheng P., Liao D.-Z., Yan S.-P. The self-assembly of a heteronuclear complex monitored with ESI-MS and fluorescence spectrophotometry. *Cryst. Eng. Comm*. 2009;11(9):1811–1814. DOI: 10.1039/B904704M.
37. Chen J. C. Z. Kristallogr. NCS. 2009;224:29–30.
38. Lago A. B., Carballo R., Fernandez-Hermida N., Vazquez-Lopez E. M. Mononuclear discrete complexes and coordination polymers based on metal(II) chelidonate complexes with aromatic N,N-chelating ligands. *Cryst. Eng. Comm*. 2011;13:941–951. DOI: 10.1039/c0ce00330a.
39. Belian M. F., Silva W. E., de Sa G. F., Alves S., de Farias R. F. Synthesis and Characterization of Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Complexes With 2,6-Pyridinedicarboxilic Acid, Chelidamic Acid, and Chelidonic Acid. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Nano-Metal Chem*. 2014;44(10):1461–1463. DOI: 10.1080/15533174.2013.809754.
40. Kamatchi T. S., Kalaivani P., Poornima P., Padma V. V., Fronczek F. R., Natarajan K. New organometallic ruthenium(II) complexes containing chelidonic acid (4-oxo-4H-pyran-2, 6-dicarboxylic acid): Synthesis, structure and in vitro biological activity. *RSC Adv*. 2014;4:2004–2022. DOI: 10.1039/C3RA43865A.
41. Qu B.-T., Lai J.-C., Liu S., Liu F., Gao Y.-D., You X.-Z. *Cryst. Growth Des*. 2015;15:1707–1720.
42. Jadreško D., Kakša M., Popović Z. Electrochemical Characteristics of 4-oxo-4H-pyranidicarboxylic Acid (Chelidonic Acid) and some of its Metal Complexes. *Electroanalysis*. 2017;29:538–547. DOI: 10.1002/elan.201600355.
43. Hopff H., Krieger A. Polyamides from heterocyclic dicarboxylic acids. *Makromol. Chemie*. 1961;47:93–113. DOI: 10.1002/macp.1961.020470109.
44. Yang H., Zhang S., Zhang Y., Zhu F., Shang L., Chen Z. Synthesis and characterization of titanium-containing styrene monomer and polymer. *Chemical Journal of Chinese Universities / Gaodeng Xue-xiao Huaxue Xuebao*. 2011;32(1):196–200.
45. Zeng J., Sun X., Shi K., Guo Q., Zhang Y., Du Z., Zhang B. Synthesis and characterization of a water-soluble dendritic polypyridine. *Nankai Daxue Suebao Ziran Kexueban*. 2007;40:34–37.
46. Katritzky A. R., Murugan R., Sakizaden K. The reactions of arylamines with chelidonic acid. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1984;21(5):1465–1467. DOI: 10.1002/jhet.5570210547.
47. Казанский Б. А., ред. Синтезы органических препаратов. М.: Справочник иностранной литературы; 1949. Справочник химика 21. Доступно по: <https://www.chem21.info/page/144239165045138228223126221096098031225102251070/>. Ссылка активна на 14.11.2022.
48. Majumdar A. K., Bag S. P. Determination of titanium and zirconium and their separation from each other with chelidonic acid. *Analitica chimica acta*. 1963;28:293–295. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)87234-7.
49. Colombo M. L., Bosisio E. Pharmacological activities of chelidonium majus (papaveraceae). *Pharmacological Research*. 1996;33(2):127–134. DOI: 10.1006/phrs.
50. Shin H.-J., Kim H.-L., Kim S.-J., Chung W.-S., Kim S.-S., Um J.-Y. Inhibitory effects of chelidonic acid on IL-6 production by blocking NF-κB and caspase-1 in HMC-1 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011;33(4):614–619. DOI: 10.3109/08923973.2011.552508.
51. Kim D.-S., Kim S.-J., Kim M.-C., Jeon Y.-D., Um J.-Y., Hong S.-H. The therapeutic effect of chelidonic acid on ulcerative colitis. *Biol. Pharm. Bull.* 2012;35(5):666–671. DOI: 10.1248/bpb.35.666.
52. Jeong H.-J., Yang S.-Y., Kim H.-Y., Kim N.-R., Jang J.-B., Kim H.-M. Chelidonic acid evokes antidepressant-like effect through the up-regulation of BDNF in forced swimming test. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(14):1559–1567. DOI: 10.1177/1535370216642044.
53. Liu H., Zheng Y.-F., Li C.-Y., Zheng Y.-Y., Wang D.-Q., Wu Z., Huang L., Wang Y.-G., Li P.-B., Peng W., Su W.-W. Discovery of Anti-inflammatory Ingredients in Chinese Herbal Formula Kouyan-qing Granule based on Relevance Analysis between Chemical Characters and Biological Effects. *Sci Rep*. 2015;10(5):18080. DOI: 10.1038/srep18080.
54. Xavier G. M., Sá A. R. D., Guimarães A. L. S., Silva T. A. D., Gomez R. S. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1β, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med*. 2007;36:476–481. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2007.00560.x.
55. Gupta P., Ashok L., Naik S. R. Assessment of serum interleukin-8 as a sensitive serological marker in monitoring the therapeutic effect of levamisole in recurrent aphthous ulcers: A randomized control study. *Indian J. Dent. Res.* 2014;25(3):284–289. DOI: 10.4103/0970-9290.138293.
56. Scully C., Porter S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Brit. J. Oral Max. Surg.* 2008;46(3):198–206. DOI: 10.1016/j.bjoms.2007.07.201.
57. Tobita T., Izumi K., Feinberg S. E. Development of an *in vitro* model for radiation-induced effects on oral keratinocytes. *Int. J. Oral Max. Surg.* 2010;39:364–370. DOI: 10.1016/j.intom.2009.12.020.
58. Oh H.-A., Kim H.-M., Jeong H.-J. Beneficial effects of chelidonic acid on a model of allergic rhinitis. *Int. Immunopharmacol*. 2011;11(1):39–45. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.10.002.

59. Singh Dh. K., Gulati K., Ray A. Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats. *International Immunopharmacology*. 2016;40:229–234. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.009.
60. Porter T. G., Martin D. L. Chelidonic acid and other conformationally restricted substrate analogues as inhibitors of rat brain glutamate decarboxylase. *Biochem Pharmacol*. 1985;34(23):4145–4150. DOI: 10.1016/0006-2952(85)90207-2.
61. Borthwick E. B., Connell S. J., Tudor D. W., Robins D. J., Shneier A., Abell C., Coggins J. R. *Biochem. J.* 1995;305:521–524. DOI: 10.1042/bj3050521.
62. Hamada Y., Suzuk K., Nakanishi T., Sarma D., Ohta H., Yamaguchi R., Yamasaki M., Hidaka K., Ishiura S., Kiso Y. Structure–activity relationship study of BACE1 inhibitors possessing a chelidonic or 2,6-pyridinedicarboxylic scaffold at the P2 position. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014;24:618–623. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.007.
63. Hoch M. Organotin compounds in the environment—an overview. *Appl Geochem*. 2001;16(7–8):719–743. DOI: 10.1016/S0883-2927(00)00067-6.
64. Carraher C. Macromolecules containing metal and metal-like elements: Group IVA Polymers. Hoboken (NJ): Wiley. 2005;4:263. DOI: 10.1002/0471712566.
65. Zhao A., Shahi K., Roner R., Barot G., Fiore T., Pellerito C., Scopelliti M., Pellerito L., Carraher C. Ciprofloxacin polymers derived from dialytin and divinyltin dihalides. *J Polym Mater*. 2008;25:87–109.
66. Sivajothi V., Dey A., Jayakar B., Rajkapoor B. Antihyperglycemic property of *Tragia cannabina* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food*. 2007;10:361–365. DOI: 10.1089/jmf.2006.030.
67. Sivajothi V., Dakappa Sh. Sh. In vitro and in silico antidiabetic activity of pyran ester derivative isolated from *Tragia cannabina* Asian Pac. *J Trop Biomed*. 2014;4(1):S455–S459. DOI: 10.12980/APJTB.4.2014C1049.
68. Шелых Т. Н., Рогачевский И. В., Плахова В. Б., Домнин И. Н., Подзорова С. А., Крылов Б. В. Снижение возбудимости ноцицепторов при воздействии гамма-пиридононов. *Сенсорные системы*. 2008;22(3):248–256.
69. Рогачевский И. В., Плахова В. Б., Домнин И. Н., Подзорова С. А., Крылов Б. В. Физиологическая роль γ-пирионов. *Клиническая патофизиология*. 2006;1:15–23.
70. Aytemir M. D., Uzbay T., Erol D. D. New 4(1H)-Pyridinone Derivatives as Analgesic Agents. *Drug Research*. 1999;49(1):250–254. DOI: 10.1055/s-0031-1300409.
71. Öztürk G., Erol D. D., Aytemir M. D., Uzbay T. New analgesic and antiinflammatory agents 4(1H)-pyridinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. 2002;37:829–834. DOI: 10.1016/s0223-5234(02)01390-9.
72. Avdeeva E., Shults E., Rybalova T., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Khlusov I., Guryev A., Belousov M. Chelidonic Acid and Its Derivatives from *Saussurea Controversa*: Isolation, Structural Elucidation and Influence on the Osteogenic Differentiation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Biomolecules*. 2019;9(5):189. DOI: 10.3390/biom9050189.
73. Avdeeva E., Porokhova E., Khlusov I., Rybalova T., Shults E., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Sukhodolo I., Belousov M. Calcium Chelidonate: Semi-Synthesis, Crystallography, and Osteoinductive Activity In Vitro and In Vivo. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(6):579. DOI: 10.3390/ph14060579.
74. Avdeeva E. Y., Skorokhodova M. G., Sukhodolo I. V., Porokhova E., Slizovsky G. V., Mushtovatova L. S., Reshetov Y. E., Ivanov S. D., Belousov M. V. Comparative evaluation of osteogenic activity and the effect on hematopoietic function of bone marrow of fractions of *Saussurea controversa* and *Filipendula ulmaria* extracts in experimental osteomyelitis. *Bull. Sib. Med.* 2019;18:6–14. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-3-6-14. 34.
75. Avdeeva E., Shults E., Skorokhodova M., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., Krasnov E., Belousov M. Flavonol Glycosides from *Saussurea controversa* and Their Efficiency in Experimental Osteomyelitis. *Planta Medica International Open*. 2018;5(01):e24–e29. DOI: 10.1055/s-0044-100799.
76. Bae S. J., Kim H. J., Won H. Y., Min Y. K., Hwang E. S. Acceleration of osteoblast differentiation by a novel osteogenic compound, DMP-PYT, through activation of both the BMP and Wnt pathways. *Scientific Reports*. 2017;7(1):8455. DOI: 10.1038/s41598-017-08190-9.
77. Kang H., Shih Y.-R. V., Nakasaki M., Kabra H., Varghese S. Small molecule–driven direct conversion of human pluripotent stem cells into functional osteoblasts. *Science Advances*. 2016;2(8):e1600691. DOI: 10.1126/sciadv.1600691.
78. Zofkova I., Nemcikova P., Matucha P. Trace elements and bone health. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013;51(8):1555–61. DOI: 10.1515/cclm-2012-0868.
79. Lemaire T., Naili S. Possible role of calcium permselectivity in bone adaptation. *Medical Hypotheses*. 2012;78(3):367–369. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.12.005.
80. Sparidans R. W., Twiss I. M., Talbot S. Bisphosphonates in bone diseases. *Pharmacy World and Science*. 1998;20:206–213. DOI: 10.1023/A:1008626026484.
81. Dahl S. G., Allain P., Marie P. J., Maura Y., Boivin G., Ammann P., Tsouderos Y., Delmas P. D., Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*. 2001;28(4):446–453. DOI: 10.1016/S8756-3282(01)00419-7.
82. Luhmann T., Germershaus O., Groll J., Meinel L. Bone targeting for the treatment of osteoporosis. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):198–213. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.001.
83. Jahnke W., Bold G., Marzinik A. L., Ofner S., Pellé X., Cotessta S., Bourgier E., Lehmann S., Henry C., Hemmig R., Stauffer F., Hartwieg J. C. D., Green, J. R., Rondeau J.-M. A general strategy for targeting drugs to bone. *Angewandte Chemie*. 2015;54:14575–14579. DOI: 10.1002/anie.201507064.
84. Hirabayashi H., Fujisaki J. Bone-Specific Drug Delivery Systems. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003;42:1319–1330. DOI: 10.2165/00003088-200342150-00002.
85. Cawthray J., Wasan E., Wasan K. Bone-seeking agents for the treatment of bone disorders. *Drug Delivery and Translational Research*. 2017;7:466–481. DOI: 10.1007/s13346-017-0394-3.

## REFERENCES

1. Batakov E. A., Alekseev D. G., Batakov V. E. Modern aspects of diagnosis and treatment of chronic osteomyelitis. Samara: Medicina; 2008. 117 p. (In Russ.)
2. Ezhov I. Ju., Korytkin A. A., Bobrov M. I., Zagrekov V. I., Shebahev A. V. The problem of purulent-necrotic and early purulent-septic complications in hip arthroplasty. *Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center*. 2010;5(1):22–25. (In Russ.)
3. Kofron M. D., Laurencin C. T. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006;58:555–576. DOI: 10.1016/j.addr.2006.03.008.
4. James A. W., LaChaud G., Shen J., Asatrian G., Nguyen V., Zhang X., Ting K., Soo C. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2016;22:284–297. DOI: 10.1089/ten.TEB.2015.0357.
5. Horcajada M. N., Offord E. Naturally Plant-Derived Compounds: Role in Bone Anabolism. *Current Molecular Pharmacology*. 2012;5(2):205–218. DOI: 10.2174/1874467211205020205.
6. Cavalieri L. F. The chemistry of the monocyclic alpha- and gamma-pyrone. *Chem. Rev.* 1947;41(3):525–84. DOI: 10.1021/cr60130a004.
7. Leopold A. C., Scott F. I., Klein W. H., Ramstad E. Chelidonic acid and its effects on plant growth. *Physiologia Plantarum*. 1952;5:85–90. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1952.tb08232.x.
8. Quin L. D., Tyrell J. A. Fundamentals of Heterocyclic Chemistry: Importance in Nature and in the Synthesis of Pharmaceuticals. John & Wiley Sons: New York; 2010. 327 p.
9. Obydenov D. L., Rschenthaler G.-V., Sosnovskikh V. Ya. An improved synthesis and some reactions of diethyl 4-oxo-4H-pyran-2,5-dicarboxylate. *Tetrahedron Letters*. 2013;54:6545–6548. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.09.100.
10. Yasodha V., Govindarajan S., Low J. N., Glidewell C. Cationic, neutral and anionic metal(II) complexes derived from 4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylic acid (chelidonic acid). *Acta Crystallogr C*. 2007;63(5):207–215. DOI: 10.1107/S010827010701459X.
11. Carraher C. E., Ayuba M., Ronerb M. R., Moricb A., Trang N. T. Synthesis, structural characterization, and ability to inhibit the growth of pancreatic cancer by organotin polymers containing chelidonic acid. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*. 2013;1(1):65–73. DOI: 10.1080/22243682.2013.774522.

12. Probst, Dzhozef M. A. Beschreibung und Darstellungsweise einiger bei der Analyse des Chelidonium majus aufgefundenen Stoffe. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1839;29(2):113–131. DOI: 10.1002/JLAC.18390290202.
13. Lerch, Udo J., der Chelidonsäure U. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. 1846;57:273–318.
14. Wayne A. Bough, J. E. Gander Isolation and characterization of chelidonic acid from *Sorghum Vulgaris*. *Phytochemistry*. 1972;11:209–213. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)89991-4.
15. Roberts M. F., Wink M. Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. New York: Springer; 1998. P. 1–7. DOI: 10.1007/978-1-4757-2905-4\_1.
16. Singh Dh. K., Gulati K., Ray A. Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats. *Int Immunopharmacol*. 2016;40:229–234. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.009.
17. Husainova A. F. Application of physico-chemical methods of analysis for the determination of chelidonic acid. Chemistry and chemical technology in the XXI century. In: XX International Scientific and Practical Conference named after Professor L.P. Kulev of students and young scientists. May 20–23, 2019. Tomsk: TPU Publishing House; 2019. P. 288–289. (In Russ.)
18. Ramstadt E. The presence and distribution of chelidonic acid in some plant families. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*. 1953;28(2–3):45–57.
19. Bruce L., Bohm A. Biosynthesis of Chelidonic Acid I. Preliminary Observation on the Precursors of Chelidonic Acid in *Convallaria majalis* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1966;115:181–186. DOI: 10.1016/s0003-9861(66)81054-8.
20. Malcolm M. J., Gear J. R. The biosynthesis of chelidonic acid *Can. J. Biochem*. 1971;49:412–416. DOI: 10.1139/o71-060.
21. Ueda M., Ohnuki T., Yamamura S. Leaf-opening substance of a nyctinastic plant, *Cassia mimosoides*. *Phytochemistry*. 1998;49:633–635. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00134-4.
22. Shen Z-W., Fisinger U., Poulev A., Eisenreich W., Werner I., Pleiner E., Bacher A., Zenk M. H Tracer studies with 13C-labeled carbohydrates in cultured plant cells. Retrosynthetic analysis of chelidonic acid biosynthesis. *Phytochemistry*. 2001;57(1):33–42. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00496-9.
23. Naicker Ch. Identification and quantification of chelidonic acid and other ligands with potential for Ni uptake in the hyperaccumulator, Berkheya coddii. [Dissertation]. Westville, Durban: University of KwaZulu-Natal; 2014.
24. Yasodha V., Govindarajan S., Starosta W., Leciejewicz J. New metal-organic framework solids built from barium and isolectronic chelidamic and chelidonic acids. *J Chem Crystallography*. 2011;41:1988–1997. DOI: 10.1007/s10870-011-0194-4.
25. Lago A., Carballo R., Fernandez-Hermida N., Rodriguez-Hermida S., Vazquez-Lopez E. Coordination polymers with chelidonate (4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylate) anions and dmso: [Zn(chel)(dmso)2] and linkage isomers of [Co(chel)(domso)(H2O)3]·H2O. *Journal of Molecular Structure*. 2011;1003(1–3):121–128. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2011.07.050.
26. Fainerman-Melnikova M., Clegg J., Pakchung A., Jensen P., Codd R. Structural diversity of complexes between Cu(II) or Ni(II) and endocyclic oxygen- or nitrogen-containing ligands: synthesis, x-ray structure determinations and circular dichroism spectra. *Cryst Eng Comm*. 2010;12:4217–4225. DOI: 10.1039/C0CE00323A.
27. Zhang Z., Zhang S., Li Y., Niu Z., Shi W., Cheng P. Systematic investigation of the lanthanide coordination polymers with 4H-pyran-2,6-dicarboxylic acid. *Cryst Eng Comm*. 2010;12:1809–1815. DOI: 10.1039/B919056B.
28. Carballo R., Covelo B., Fernandez-Hermida N., Vazquez-Lopez E. Synthesis and structures of two one-dimensional coordination polymers: [Co(NCS)2(dpds)2] and [Cu(ox)2Im]2. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*. 2007;633(11–12):1787–1790. DOI: 10.1002/zaac.200700123.
29. Belian M. F., Silva W. E., de Sá G. F., Alves S., de Farias R. F. Synthesis and Characterization of Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Complexes With 2,6-Pyridinedicarboxylic Acid, Chelidamic Acid, and Chelidonic Acid. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*. 2014;44(10):1461–1463. DOI: 10.1080/15533174.2013.809754.
30. Manojlovic-Muir L., Muir K. W., Campbell R. A., Mckendrick J. E., Robins D. J. Pentaaqua(chelidonato-O4)copper(II) monohydrate. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 1999;55(2):178–180. DOI: 10.1107/S0108270198011895.
31. Ng S. W., Raj S. S. S., Fun H.-K., Razak I. A., Hook J. M. Linear chains in polymeric dicyclohexylammonium tributyl(4-oxo-4H-pyran-2,6-dicarboxylato)stannate and methylphenylammonium tributyl(pyridine-2,6-dicarboxylato)stannate containing trigonal bipyramidal tin. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 2000;56(8):966–968. DOI: 10.1107/S0108270100008106.
32. Fainerman-Melnikova M., Clegg J. K., Codd R., Yashoda V., Govindarajan S., Low J. N., Glidewell C., Aqua[bis(2-pyridylmeth-yl) amine][chelidonato(1.5-)]copper(II) chelidonate(0.5-) monohydrate. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*. 2006;62(12):m3582–m3584. DOI: 10.1107/S1600536806050677.
33. Yashoda V., Govindarajan S., Manivannan V. Büyükgüngör O. Hexaaquanickel(II) chelidonate monohydrate. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*. 2007;63(11):m2720. DOI: 10.1107/S1600536807049045.
34. Eubank J. F., Kravtsov V. Ch., Eddaoudi M. Synthesis of organic photodimeric cage molecules based on cycloaddition via metal-ligand directed assembly. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(18):5820–5821. DOI: 10.1021/ja070924n.
35. Zhou X.-X., Liu M.-S., Lin X.-M., Fang H.-C., Chen J.-Q., Yang D.-Q., Cai Y.-P. Construction of three low dimensional ZN(II) complexes based on different organic-carboxylic acids. *Inorg. Chim. Acta*. 2009;362:1441–1447. DOI: 10.1016/j.ica.2008.07.015.
36. Zhang Z-J., Shi W., Huang Y-Q., Zhao B., Cheng P., Liao D-Z., Yan S-P. The self-assembly of a heteronuclear complex monitored with ESI-MS and fluorescence spectrophotometry. *Cryst. Eng. Comm*. 2009;11(9):1811–1814. DOI: 10.1039/B904704M.
37. Chen J. C. Z. Kristallogr. NCS. 2009;224:29–30.
38. Lago A. B., Carballo R., Fernandez-Hermida N., Vazquez-Lopez E. M. Mononuclear discrete complexes and coordination polymers based on metal(II) chelidonate complexes with aromatic N,N-chelating ligands. *Cryst. Eng. Comm*. 2011;13:941–951. DOI: 10.1039/c0ce00330a.
39. Belian M. F., Silva W. E., de Sa G. F., Alves S., de Farias R. F. Synthesis and Characterization of Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Complexes With 2,6-Pyridinedicarboxylic Acid, Chelidamic Acid, and Chelidonic Acid. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Nano-Metal Chem*. 2014;44(10):1461–1463. DOI: 10.1080/15533174.2013.809754.
40. Kamatchi T. S., Kalaivani P., Poornima P., Padma V. V., Fronczek F. R., Natarajan K. New organometallic ruthenium(II) complexes containing chelidonic acid (4-oxo-4H-pyran-2, 6-dicarboxylic acid): Synthesis, structure and in vitro biological activity. *RSC Adv*. 2014;4:2004–2022. DOI: 10.1039/C3RA43865A.
41. Qu B.-T., Lai J.-C., Liu S., Liu F., Gao Y.-D., You X.-Z. *Cryst. Growth Des*. 2015;15:1707–1720.
42. Jadreško D., Kakša M., Popović Z. Electrochemical Characteristics of 4-oxo-4H-pyridinedicarboxylic Acid (Chelidonic Acid) and some of its Metal Complexes. *Electroanalysis*. 2017;29:538–547. DOI: 10.1002/elan.201600355.
43. Hopff H., Krieger A. Polyamides from heterocyclic dicarboxylic acids. *Makromol. Chemie*. 1961;47:93–113. DOI: 10.1002/macp.1961.020471019.
44. Yang H., Zhang S., Zhang Y., Zhu F., Shang L., Chen Z. Synthesis and characterization of titanium-containing styrene monomer and polymer. *Chemical Journal of Chinese Universities / Gaodeng Xue-xiao Huaxue Xuebao*. 2011;32(1):196–200.
45. Zeng J., Sun X., Shi K., Guo Q., Zhang Y., Du Z., Zhang B. Synthesis and characterization of water-soluble dendritic polypyridine. *Nankai Daxue Suebao Ziran Kexueban*. 2007;40:34–37.
46. Katritzky A. R., Murugan R., Sakizaden K. The reactions of arylamines with chelidonic acid. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1984;21(5):1465–1467. DOI: 10.1002/JHET.5570210547.
47. Kazansky B. A., editors. Syntheses of organic preparations. Moscow: Reference book of foreign literature; 1949. Chemist's Handbook 21. Available at: <https://www.chem21.info/page/144239165045138228223126221096098031225102251070/> Accessed: 14.11.2022. (In Russ.)

48. Majumdar A. K., Bag S. P. Determination of titanium and zirconium and their separation from each other with chelidonic acid. *Analitica chimica acta.* 1963;28:293–295. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)87234-7.
49. Colombo M. L., Bosisio E. Pharmacological activities of chelidonium majus. (papaveraceae). *Pharmacological Research.* 1996;33(2):127–134. DOI: 10.1006/phrs.
50. Shin H.-J., Kim H.-L., Kim S.-J., Chung W.-S., Kim S.-S., Um J.-Y. Inhibitory effects of chelidonic acid on IL-6 production by blocking NF-κB and caspase-1 in HMC-1 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011;33(4):614–619. DOI: 10.3109/08923973.2011.552508.
51. Kim D.-S., Kim S.-J., Kim M.-C., Jeon Y.-D., Um J.-Y., Hong S.-H. The therapeutic effect of chelidonic acid on ulcerative colitis. *Biol. Pharm. Bull.* 2012;35(5):666–671. DOI: 10.1248/bpb.35.666.
52. Jeong H.-J., Yang S.-Y., Kim H.-Y., Kim N.-R., Jang J.-B., Kim H.-M. Chelidonic acid evokes antidepressant-like effect through the up-regulation of BDNF in forced swimming test. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(14):1559–1567. DOI: 10.1177/1535370216642044.
53. Liu H., Zheng Y.-F., Li C.-Y., Zheng Y.-Y., Wang D.-Q., Wu Z., Huang L., Wang Y.-G., Li P.-B., Peng W., Su W.-W. Discovery of Anti-inflammatory Ingredients in Chinese Herbal Formula Kouyanqing Granule based on Relevance Analysis between Chemical Characters and Biological Effects. *Sci Rep.* 2015;10(5):18080. DOI: 10.1038/srep18080.
54. Xavier G. M., Sá A. R. D., Guimarães A. L. S., Silva T. A. D., Gomez R. S. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med.* 2007;36:476–481. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2007.00560.x.
55. Gupta P., Ashok L., Naik S. R. Assessment of serum interleukin-8 as a sensitive serological marker in monitoring the therapeutic effect of levamisole in recurrent aphthous ulcers: A randomized control study. *Indian J. Dent. Res.* 2014;25(3):284–289. DOI: 10.4103/0970-9290.138293.
56. Scully C., Porter S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Brit. J. Oral Max. Surg.* 2008;46(3):198–206. DOI: 10.1016/j.bjoms.2007.07.201.
57. Tobita T., Izumi K., Feinberg S. E. Development of an *in vitro* model for radiation-induced effects on oral keratinocytes. *Int. J Oral Max. Surg.* 2010;39:364–370. DOI: 10.1016/j.intom.2009.12.020.
58. Oh H.-A., Kim H.-M., Jeong H.-J. Beneficial effects of chelidonic acid on a model of allergic rhinitis. *Int. Immunopharmacol.* 2011;11(1):39–45. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.10.002.
59. Singh Dh. K., Gulati K., Ray A. Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats. *International Immunopharmacology.* 2016;40:229–234. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.009.
60. Porter T. G., Martin D. L. Chelidonic acid and other conformationally restricted substrate analogues as inhibitors of rat brain glutamate decarboxylase. *Biochem Pharmacol.* 1985;34(23):4145–4150. DOI: 10.1016/0006-2952(85)90207-2.
61. Borthwick E. B., Connell S. J., Tudor D. W., Robins D. J., Shneier A., Abell C., Coggins J. R. *Biochem. J.* 1995;305:521–524. DOI: 10.1042/bj3050521.
62. Hamada Y., Suzuk K., Nakanishi T., Sarma D., Ohta H., Yamaguchi R., Yamasaki M., Hidaka K., Ishiura S., Kiso Y. Structure–activity relationship study of BACE1 inhibitors possessing a chelidonic or 2,6-pyridinedicarboxylic scaffold at the P2 position. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2014;24:618–623. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.007.
63. Hoch M. Organotin compounds in the environment—an overview. *Appl Geochem.* 2001;16(7–8):719–743. DOI: 10.1016/S0883-2927(00)00067-6.
64. Carragher C. Macromolecules containing metal and metal-like elements: Group IVA Polymers. *Hoboken (NJ): Wiley.* 2005;4:263. DOI: 10.1002/0471712566.
65. Zhao A., Shahi K., Roner R., Barot G., Fiore T., Pellerito C., Scopelliti M., Pellerito L., Carragher C. Ciprofloxacin polymers derived from dialytin and divinyltin dihalides. *J Polym Mater.* 2008;25:87–109.
66. Sivajothi V., Dey A., Jayakar B., Rajkumar B. Antihyperglycemic property of *Tragia cannabina* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food.* 2007;10:361–365. DOI: 10.1089/jmf.2006.030.
67. Sivajothi V., Dakappa Sh. Sh. In vitro and in silico antidiabetic activity of pyran ester derivative isolated from *Tragia cannabina* Asian Pac. *J Trop Biomed.* 2014;4(1):S455–S459. DOI: 10.12980/APJT.B.4.2014C1049.
68. Shelykh T. N., Rogachevsky I. V., Plakhova V. B., Dominin I. N., Podzorova S. A., Krylov B. V. g-Pyridones Decrease the Excitability of Nociceptors. *J. Sensory Systems.* 2008;22(3):248–256. (In Russ.)
69. Rogachevskij I. V., Plahova V. B., Dominin I. N., Podzorova S. A., Krylov B. V. Physiological role of γ-pyrone. *Clinical pathophysiology.* 2006;1:15–23. (In Russ.)
70. Aytemir M. D., Uzbay T., Erol D. D. New 4(1H)-Pyridinone Derivatives as Analgesic Agents. *Drug Research.* 1999;49(1):250–254. DOI: 10.1055/s-0031-1300409.
71. Öztürk G., Erol D. D., Aytemir M. D., Uzbay T. New analgesic and antiinflammatory agents 4(1H)-pyridinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2002;37:829–834. DOI: 10.1016/s0223-5234(02)01390-9.
72. Avdeeva E., Shults E., Rybalova T., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Khlusov I., Guryev A., Belousov M. Chelidonic Acid and Its Derivatives from *Saussurea Controversa*: Isolation, Structural Elucidation and Influence on the Osteogenic Differentiation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Biomolecules.* 2019;9(5):189. DOI: 10.3390/biom9050189.
73. Avdeeva E., Porokhova E., Khlusov I., Rybalova T., Shults E., Litvinova L., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Sukhodolo I., Belousov M. Calcium Chelidonate: Semi-Synthesis, Crystallography, and Osteoinductive Activity In Vitro and In Vivo. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(6):579. DOI: 10.3390/ph14060579.
74. Avdeeva E. Y., Skorokhodova M. G., Sukhodolo I. V., Porokhova E., Slizovsky G. V., Mushtovatova L. S., Reshetov Y. E., Ivanov S. D., Belousov M. V. Comparative evaluation of osteogenic activity and the effect on hematopoietic function of bone marrow of fractions of *Saussurea controversa* and *Filipendula ulmaria* extracts in experimental osteomyelitis. *Bull. Sib. Med. Sci.* 2019;18:6–14. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-3-6-14.34.
75. Avdeeva E., Shults E., Skorokhodova M., Reshetov Y., Porokhova E., Sukhodolo I., Krasnov E., Belousov M. Flavonol Glycosides from *Saussurea controversa* and Their Efficiency in Experimental Osteomyelitis. *Planta Medica International Open.* 2018;5(01):e24–e29. DOI: 10.1055/s-0044-100799.
76. Bae S. J., Kim H. J., Won H. Y., Min Y. K., Hwang E. S. Acceleration of osteoblast differentiation by a novel osteogenic compound, DMP-PYT, through activation of both the BMP and Wnt pathways. *Scientific Reports.* 2017;7(1):8455. DOI: 10.1038/s41598-017-08190-9.
77. Kang H., Shih Y.-R. V., Nakasaki M., Kabra H., Varghese S. Small molecule–driven direct conversion of human pluripotent stem cells into functional osteoblasts. *Science Advances.* 2016;2(8):e1600691. DOI: 10.1126/sciadv.1600691.
78. Zofkova I., Nemcikova P., Matucha P. Trace elements and bone health. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2013;51(8):1555–61. DOI: 10.1515/clcm-2012-0868.
79. Lemaire T., Naili S. Possible role of calcium permeability in bone adaptation. *Medical Hypotheses.* 2012;78(3):367–369. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.12.005
80. Sparidans R. W., Twiss I. M., Talbot S. Bisphosphonates in bone diseases. *Pharmacy World and Science.* 1998;20:206–213. DOI: 10.1023/A:1008626026484.
81. Dahl S. G., Allain P., Marie P. J., Mauras Y., Boivin G., Ammann P., Tsouderos Y., Delmas P. D., Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone.* 2001;28(4):446–453. DOI: 10.1016/S8756-3282(01)00419-7.
82. Luhmann T., Germershausen O., Groll J., Meinel L. Bone targeting for the treatment of osteoporosis. *Journal of Controlled Release.* 2012;161(2):198–213. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.001.
83. Jahnke W., Bold G., Marzinik A. L., Ofner S., Pellé X., Cotessta S., Bourgier E., Lehmann S., Henry C., Hemmig R., Stauffer F., Hartwieg J. C. D., Green, J. R., Rondeau J.-M. A general strategy for targeting drugs to bone. *Angewandte Chemie.* 2015;54:14575–14579. DOI: 10.1002/anie.201507064.
84. Hirabayashi H., Fujisaki J. Bone-Specific Drug Delivery Systems. *Clinical Pharmacokinetics.* 2003;42:1319–1330. DOI: 10.2165/00003088-200342150-00002.
85. Cawthray J., Wasan E., Wasan K. Bone-seeking agents for the treatment of bone disorders. *Drug Delivery and Translational Research.* 2017;7:466–481. DOI: 10.1007/s13346-017-0394-3.



Международная выставка и форум  
по фармацевтике и биотехнологиям

**11–13 апреля 2023**

Санкт-Петербург, Экспофорум, павильон Н

[gotoipheb.ru](http://gotoipheb.ru)

Санкт-Петербург –  
лучшее место  
для бизнеса

**11**  
стран

**3000+**  
посетителей

**100+**  
экспонентов



**Международное событие для участников  
фармацевтического и смежных рынков  
(БАД и здоровое питание)**

признанная платформа для встречи с ведущими фармацевтическими компаниями  
со всего мира на одной площадке

Поддержка:



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ  
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ  
ПАЛАТА

СПХФУ  
с 1919 года на службе  
науки и здоровья нации



Санкт-Петербургский  
государственный химико-  
фармацевтический университет

Организатор:





## Применение технологии твердой дисперсии для получения модели инъекционной лекарственной формы производного индолокарбазола

А. П. Колпаксиди<sup>1,2</sup>✉, М. В. Дмитриева<sup>1</sup>, О. Л. Орлова<sup>1</sup>, Л. В. Экторва<sup>1</sup>, И. И. Краснюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 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

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

✉ Контактное лицо: Колпаксиди Александр Павлович. E-mail: aleksandrkolpaksidi@gmail.com

ORCID: А. П. Колпаксиди – <https://orcid.org/0000-0001-9388-1019>; М. В. Дмитриева – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>; Л. В. Экторва – <https://orcid.org/0000-0002-3987-6072>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 23.12.2021

Статья принята в печать: 16.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России синтезировано производное индолокарбазола с углеводным остатком ксилозой, обладающее выраженной цитотоксической и антиangiогенной активностью. Субстанция ЛХС-1269 представляет собой аморфный порошок, практически нерастворимый в воде, что обуславливает трудности в разработке инъекционной лекарственной формы (ИЛФ). Для решения данной проблемы предложено использование технологического подхода по получению твердой дисперсии (ТД) ЛХС-1269.

**Цель.** Разработать модель ИЛФ производного индолокарбазола ЛХС-1269 на основе ТД.

**Материалы и методы.** В работе использована субстанция ЛХС-1269, синтезированная в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. В качестве носителя активной субстанции исследовали Kolliphor® Р 188, Soluplus®, Lutrol® F68, Kollidon® 12 и Kollidon® 17, эмульсия 268, соевый фосфатидилхолин ненасыщенный S PC и насыщенный S PC-3. ТД ЛХС-1269 получали методом удаления растворителя: активную субстанцию растворяли в ацетоне, носитель – в хлороформе, полученные растворы смешивали, переносили во флакон и упаривали под вакуумом ( $50 \pm 5$  мбар) в экскаторе при температуре водяной бани  $65 \pm 2$  °C. Для получения водного раствора ЛХС-1269 сухую массу растворяли с использованием различных вспомогательных веществ или их смесей: воды для инъекций, спирта этилового 95%-го, спирта бензилового, Kollisolv® PEG 400, MONTANOX™ 80. Для повышения стабильности водный раствор ЛХС-1269 лиофилизовали в камере сублимационной установки Edwards Minifast DO.2.

**Результаты и обсуждение.** В качестве материала-носителя для получения ТД активной субстанции выбран Kollidon® 17. Установлено, что прозрачный раствор ЛХС-1269 с концентрацией действующего вещества 0,5% образуется при растворении ТД в этаноле 95 % и последующем постепенном разведении спиртовой смеси водой для инъекций. При этом массовое соотношение компонентов разработанной модели ИЛФ ЛХС:Kollidon® 17:спирт:вода составляет 1:40:32:127. В результате сублимационного высушивания водно-спиртового раствора ЛХС-1269 получена ИЛФ в виде лиофилизата, легко растворимого в 10%-м растворе спирта этилового.

**Заключение.** Разработана модель ИЛФ гидрофобного производного индолокарбазола ЛХС-1269 на основе ТД, которая передана на биологические исследования для оценки ее эффективности.

**Ключевые слова:** гидрофобное производное индолокарбазола, ЛХС-1269, лекарственная форма, твердая дисперсия, Kollidon®, лиофилизация

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

**Вклад авторов.** А. П. Колпаксиди осуществил проведение экспериментов, планирование, написание и редактирование статьи. М. В. Дмитриева провела эксперименты, спланировала и редактировала статью. О. Л. Орлова осуществила дизайн и организацию исследования. Л. В. Экторва подготовила обзор литературы, планирование экспериментов. И. И. Краснюк сделал дизайн исследования, проверку окончательной версии статьи.

**Для цитирования:** Колпаксиди А. П., Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Экторва Л. В., Краснюк И. И. Применение технологии твердой дисперсии для получения модели инъекционной лекарственной формы производного индолокарбазола. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):73–78. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-73-78>

## Application of Solid Dispersion Technology to Obtain a Model of Injectable Dosage Form of Indolocarbazole Derivative

Alexander P. Kolpaksidi<sup>1,2</sup>✉, Maria V. Dmitrieva<sup>1</sup>, Olga L. Orlova<sup>1</sup>, Lidia V. Ektova<sup>1</sup>, Ivan I. Krasniuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FSBi "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

<sup>2</sup> 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: Alexander P. Kolpaksidi. E-mail: aleksandrkolpaksidi@gmail.com

ORCID: Alexander P. Kolpaksidi – <https://orcid.org/0000-0001-9388-1019>; Maria V. Dmitrieva – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; Olga L. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>; Lidia V. Ektova – <https://orcid.org/0000-0002-3987-6072>; Ivan I. Krasniuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 23.12.2021

Revised: 16.09.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia synthesized an original derivative of indolocarbazole with the carbohydrate residue xylose, which has a pronounced cytotoxic and anti-angiogenic activity. The substance LCS-1269 is an amorphous powder that is almost insoluble in water, which causes difficulties in the development of an injectable dosage form (IDP). To solve this problem, a technological approach to obtain a solid dispersion (SD) of LCS-1269 has been proposed.

**Aim.** To develop a model of IDP of the indolocarbazole derivative LCS-1269 based on SD.

**Materials and methods.** We used a substance LCS-1269 synthesized in the Chemical Synthesis Laboratory of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Emuxol 268, Kolliphor® P 188, Soluplus®, Lutrol® F68, Kollidon® 12 and Kollidon® 17, soybean phosphatidylcholine unsaturated S PC and saturated S PC-3 were investigated as carriers of the active substance. SD LCS-1269 was obtained by solvent removal: the active substance was dissolved in acetone, the carrier – in chloroform, the obtained solutions were mixed, transferred into a bottle and evaporated under vacuum ( $50 \pm 5$  mbar) in the desiccator at water bath temperature  $65 \pm 2$  °C. To obtain aqueous solution of LCS-1269 dry mass was dissolved using different auxiliary substances or their mixtures: water for injection, ethanol 95 %, benzyl alcohol, Kollisolv® PEG 400, MONTANOX™ 80. To increase stability, the aqueous solution of LCS-1269 was lyophilized in an Edwards Minifast DO.2 freeze dryer.

**Results and discussion.** Kollidon® 17 was chosen as the carrier material for the SD active substance. It was found that a clear solution of LCS-1269 with the concentration of the active substance 0.5 % was formed by dissolving the SD in ethanol 95 % and then gradually diluting the alcohol mixture with water for injection. In this case, the mass ratio of the components of the developed model IDF LCS:Kollidon® 17:ethanol: water is 1:40:32:127. As a result of freeze-drying of the water-ethanol solution of LCS-1269 the IDF in the form of lyophilizate easily soluble in a 10 % solution of ethanol was obtained.

**Conclusion.** An IDF model of the hydrophobic derivative of indolocarbazole LCS-1269 based on SD was developed and submitted for biological studies to evaluate its effectiveness.

**Keywords:** hydrophobic indolocarbazole derivative, LCS-1269, dosage form, solid dispersion, Kollidon®, lyophilization

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

**Contribution of the authors.** Alexander P. Kolpaksidi carried out experiments, planning, writing and editing the article. Maria V. Dmitrieva did the experiments, planning and editing the article. Olga L. Orlova carried out the design and organization. Lidia V. Ektova prepared a review of the literature, planning experiments. Ivan I. Krasniuk designed the study, checking the final version of the article.

**For citation:** Kolpaksidi A. P., Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Ektova L. V., Krasniuk I. I. Application of solid dispersion technology to obtain a model of injectable dosage form of indolocarbazole derivative. *Drug development & registration.* 2022;11(4):73–78. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-73-78>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИЛФ	инъекционная лекарственная форма.
ЛВ	лекарственное вещество.
ТД	твердая дисперсия.
IDP	injectable dosage form.
SD	solid dispersion.

## ВВЕДЕНИЕ

Индолокарбазолы – уникальный класс индолъных алкалоидов природного или синтетического происхождения, структура которых включает в свой состав плоский гетероцикл, состоящий из индолинового и карбазольного элементов. Они обладают целым рядом терапевтических свойств, самый значимый из которых – противоопухолевый, обусловленный их способностью к инициации различных путей гибели раковых клеток. В лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России получено оригинальное гидрофобное производное индолокарбазола с углеводным остатком ксилозой ЛХС-1269 – N-{12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил}пиридин-2-карбоксамид (рисунок 1), обладающее выраженной цитотоксической и антиангиогенной активностью [1–4].

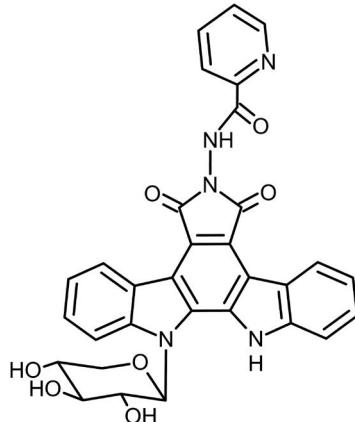


Рисунок 1. Структурная формула ЛХС-1269 [4]

Figure 1. Structural formula of LCS-1269 [4]

Субстанция ЛХС-1269 представляет собой аморфный порошок желтого цвета. Собственное предварительное исследование Лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России показывает что, в соответствии с обозначением растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, приведенных в ОФС.1.2.1.0005.15 «Раствори-

мость» ГФ XIII, данное соединение легко растворимо в диметилсульфоксиде и диметилацетамиде; мало – в ацетоне и бензоле; очень мало – в этаноле и практически нерастворимо в воде, метилене хлористом и хлороформе. Плохая растворимость в воде активного соединения обуславливает трудности в разработке инъекционных лекарственных форм (ИЛФ), а также неустойчивые характеристики абсорбции и низкую системную биодоступность. Для повышения растворимости и создания ИЛФ гидрофобных веществ используют различные физические, химические и технологические методы как по отдельности, так и в комбинации. Одним из таких методов является получение твердых дисперсных систем или твердых дисперсий фармацевтических субстанций. ТД – это би- или многокомпонентные системы, состоящие из лекарственного вещества (ЛВ) и носителя, представляющие собой высокодиспергированную твердую фазу ЛВ или молекулярно-дисперсные твердые растворы с частичным образованием комплексов переменного состава с материалом-носителем. В роли носителя в ТД обычно применяют различные вещества полимерной природы. Использование в фармацевтической технологии ЛВ, включенных в твердые дисперсные системы, позволяет увеличить растворимость и скорость растворения фармацевтических субстанций, оптимизировать технологические свойства, а также улучшить биофармацевтические параметры лекарственного препарата, обеспечить его оптимальную стабильность [5–8].

**Целью настоящего исследования** являлась разработка модели ИЛФ производного индолокарбазола ЛХС-1269 на основе ТД.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы и реагенты:** субстанция ЛХС-1269 серии 010320 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России); Kolliphor® P 188 BIO (BASF, Германия), Soluplus® (BASF, Германия), Lutrol® F68 (BASF, Германия), Kollidon® 12 PF и Kollidon® 17 PF (BASF, Германия), Kollisolv® (BASF, Германия), эмуксол 268 (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), соевый фосфатидилхолин S PC (Lipoid, Германия), соевый фосфатидилхолин гидрогенизованный S PC-3 (Lipoid, Германия), Kollisolv® PEG 400 – полиэтиленгликоль (ПЭГ)-400 (BASF, Германия), MONTANOX™ 80 (Seppic, Франция); вода для инъекции ФС.2.2.0019.18, спирт этиловый 95 % (ООО «Гиппократ», Россия), бензиловый спирт х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия), ацетон ч.д.а. (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), хлороформ х.ч. (ООО «Компонент-Реактив», Россия).

**Оборудование:** весы лабораторные DL-120 (AND, Япония), весы аналитические OHAUS Analytical Plus AP100S (OHAUS Corporation, США), ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma Schmidbauer GmbH, Германия), магнитная мешалка IKA® C-MAG HS 4 (IKA Werke GmbH & Co KG, Германия), система получения воды для инъекций УВОИ-МФ-1812 (АО «НПК МЕ-

ДИАНА-ФИЛЬТР», Россия), система для фильтрации Stericup® GP с мембранный Millipore Express® Plus с полиэфирсульфоновыми фильтрами, имеющими размер пор 0,22 мкм (Merck KGaA, Германия), вакуумный контроллер V-855 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария), вакуумный насос Büchi V-700 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария), водяная баня Büchi B-491 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария), сублимационная сушка Edwards Minifast DO.2 (Ero Electronic S.p. A., Италия).

## Методы

**Получение твердой дисперсии.** Для приготовления твердых дисперсий ЛХС-1269 использовали метод «удаление растворителя», который заключается в растворении активной субстанции и материала-носителя в органическом растворителе с последующей отгонкой растворителя в условиях низкого давления [6].

**Фильтрация.** Водно-спиртовой раствор ЛХС-1269 фильтровали с использованием системы Stericup® GP с мембранный Millipore Express® Plus с полиэфирсульфоновыми фильтрами.

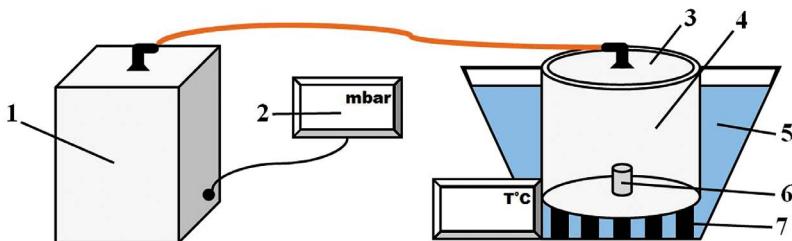
**Лиофилизация.** Флаконы с образцом помещали в камеру сублимационной сушки при комнатной температуре +(20–25) °C. Препарат замораживали, используя «медленное» понижение температуры: охлаждение от комнатной температуры до -5 °C с выдерживанием в течение 30 мин, охлаждение от -5 до -40 °C со скоростью -10 °C/ч. После достижения и уравновешивания минимальной температуры продукта флаконы с препаратом выдерживали в течение 3 ч, далее начинали откачуку воздуха из камеры сублимационной установки. После включения вакуумного насоса и выравнивания вакуума (около 3 ч) осуществляли: нагрев полок до температуры -25 °C со скоростью 2 °C/ч и выдерживание полок на температуре -25 °C в течение 3 ч, нагрев полок до температуры -5 °C со скоростью 1 °C/ч и нагрев полок до комнатной температуры +(20–22) °C со скоростью +5 °C/ч. Далее препарат досушивали для удаления остаточной влаги около 3 ч по критерию неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере при перекрывании вакуумной магистрали. Для определения эвтектической температуры препарата использовали термический способ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение ТД ЛХС-1269

Для получения ТД ЛХС-1269 проводили комплекс исследований по подбору оптимальных технологических параметров: типа материала-носителя и органического растворителя для растворения субстанции ЛХС-1269 и материала-носителя; условий отгонки органического растворителя из полученного раствора; условий растворения ТД в воде.

Метод «удаление растворителя» является наиболее простой технологией приготовления ТД фармацевтической субстанции. Для получения орга-



**Рисунок 2. Самосборная лабораторная установка для получения ТД ЛХС-1269**

**Figure 2. Self-assembled laboratory unit for obtaining solid dispersion LCS-1269**

нического раствора компонентов ТД применяют легколетучие доступные растворители, роль которых заключается в дезинтеграции и гомогенизации компонентов системы на молекулярном уровне, обеспечении более полного взаимодействия ЛВ и носителя [7]. Поэтому с учетом технологических требований метода и физико-химических свойств ЛХС-1269 и носителя для получения органического раствора использовали ацетон ( $T_{\text{кип.}} = 56,1^{\circ}\text{C}$ ) и хлороформ ( $T_{\text{кип.}} = 61,2^{\circ}\text{C}$ ) соответственно. С целью ускорения растворения субстанции в ацетоне применяли ультразвуковую обработку смеси.

В качестве носителя при приготовлении ТД ЛХС-1269 исследовали различные полимеры: эмуксол 268 – блок-сополимер окиси этилена с окисью пропилена и пропиленгликолем, полоксамер Kolliphor® P 188 – блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена, Soluplus® – матричный полимер ПЭГ-6000/винилкапролактам/винилацетат, Lutrol® F68 – блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилена, Kollidon® 12 и Kollidon® 17 – низкомолекулярные поливидоны; а также вещества липидной природы – соевый фосфатидилхолин насыщенный S PC-3 и ненасыщенный S PC. Модели ТД ЛХС-1269 представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Модели ТД ЛХС-1269**

**Table 1. Solid dispersion (SD) models of LHS-1269**

№ модели ТД Model No. SD	Носитель Carrier	Массовое составление ЛХС-1269/носитель Mass ratio of LCS- 1269/carrier	Внешний вид Appearance
1	Kollidon® 17	1:40	Пористая масса желтого цвета Yellow porous mass
2	Kollidon® 12		
3	Эмуксол 268 Emuxol 268	1:20	
4	Kolliphor® P 188	1:10	
5	Lutrol® F68		
6	S PC-3		
7	S PC		
8	Soluplus®	1:40	Пленка желтого цвета Yellow film

После растворения ацетоновый и хлороформный растворы смешивали и переносили в стеклянную емкость с плоским широким дном для обеспечения максимального испарения жидкости. Для отгона органических растворителей использовали самосборную лабораторную установку (рисунок 2), состоящую из вакуумного насоса (1), водяной бани (5), подставки экскатора (7), экскатора (4), а также плотно прилегающей к нему крышки с отверстием для переходника и трубки (3), ведущей к насосу. Для контроля и регулирования уровня давления использовали вакуумный контроллер (2). Флакон с полученным раствором (6) помещался на дно экскатора и начинали откачуку воздуха из экскатора. При этом для эффективного удаления органических растворителей регулировали глубину вакуума и температуру воды в бане от 40 до 70 °C для предотвращения бурного кипения ацетона и хлороформа, которое может привести к выплескиванию смеси из рабочей емкости и потере вещества. В результате подбора этих параметров установлен оптимальный режим отгона растворителей, который заключается в постепенном снижении давления от атмосферного до  $50 \pm 5$  мбар при установленной температуре бани  $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$  по мере сокращения объема смеси и досушивания полученной ТД до постоянной массы, равной сумме масс активной субстанции и носителя. Как видно из таблицы 1, при использовании в качестве носителя ТД Kollidon® обеих марок отмечается образование пористой массы, в остальных случаях – пленки на стенках рабочей емкости.

#### **Получение модели ИЛФ ЛХС-1269 на основе ТД**

В таблице 2 приведены исследуемые модельные составы ИЛФ ЛХС-1269 с концентрацией действующего вещества 0,5 %, приготовленных с использованием технологии ТД. К ТД ЛХС-1269 согласно прописям прибавляли спирт этиловый 95 % и перемешивали до получения прозрачного раствора, за исключением моделей ИЛФ № 1 и № 7. Далее частями при постоянном перемешивании смеси на магнитной мешалке при скорости вращения элемента 230–250 об/мин вводили воду для инъекций до 100 %. Если воду добавлять слишком быстро или в большим объемах, происходит помутнение раствора. Кроме того, до до-

бавления воды в модели 4, 5, и 6 вводили вспомогательные компоненты (сопастворители, солюбилизаторы, стабилизаторы). Указанные в таблице компоненты расположены в порядке их введения в смесь.

**Таблица 2. Модельные составы ИЛФ ЛХС-1269**

**Table 2. Model compositions of the injectable dosage form (IDF) LHS-1269**

№ модели ИЛФ model No. of IDF	Состав вспомогательных компонентов модели ИЛФ Composition of auxiliary components of the IDF model		Внешний вид Appearance
	Компонент Component	Концентрация, % Concentration, %	
1	Kollidon® 17	40	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
2	Kollidon® 17	20	Прозрачный раствор желтого цвета Transparent yellow solution
Спирт этиловый Ethanol	20		
3	Kollidon® 17	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
Спирт этиловый Ethanol	10		
4	Kollidon® 17	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
Спирт этиловый Ethanol	10		
Спирт бензиловый Benzyl alcohol	1		
Kollisolv® PEG 400	6,6		
Kolliphor® P 188	2,5		
5	Kollidon® 17	20	При добавлении 1/2 объема воды образуется прозрачный желтый раствор, при дальнейшем введении оставшейся части воды раствор мутнеет When 1/2 volume of water is added, a transparent yellow solution is formed, with further addition of the remaining part of the water, the solution becomes cloudy
Спирт этиловый Ethanol	10		
Спирт бензиловый Benzyl alcohol	1		
Kollisolv® PEG 400	12,4		
6	Kollidon® 17	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
Спирт этиловый Ethanol	10		
Kollisolv® PEG 400	12		
Montanox™ 80	2,5		
7	Kollidon® 17	20	Мутный раствор желтого цвета с творожистым осадком A cloudy yellow solution with a curd-like precipitate
	Kollisolv® PEG 400	20	

№ модели ИЛФ model No. of IDF	Состав вспомогательных компонентов модели ИЛФ Composition of auxiliary components of the IDF model		Внешний вид Appearance
	Компонент Component	Концентрация, % Concentration, %	
8	Kollidon® 17	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	
9	Эмуксол 268 Emuxol 268	10	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	
10	Kolliphor® P 188	5	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	15	
11	Lutrol® F68	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	
12	S PC-3	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	
13	S PC	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	
14	Soluplus®	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	

На основании полученных данных сравнительного исследования модельных композиций ИЛФ ЛХС-1269 прозрачный раствор был получен только при использовании в качестве материала-носителя Kollidon® 17 в конечной концентрации 20 % и сопастворителя спирта этилового в концентрации 20 % (состав № 2).

Стоит отметить, что с использованием Kollidon® 17 удалось создать стабильный препарат «ЛХС-1269, концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг» [8]. Мы предполагаем, что свойства [9] Kollidon® 17, как полимера, позволяют получать стабильные ЛФ ЛХС-1269; данный подход можно будет использовать в дальнейшем для создания других ЛФ ЛХС-1269.

### Лиофилизация раствора ЛХС-1269

В связи с низкой устойчивостью водно-спиртового раствора ЛХС-1269 для повышения стабильности и увеличения срока хранения модели ИЛФ на основе ТД предложено ее сублимационное высушивание. Лиофилизацию образцов проводили с учетом высокого содержания спирта этилового, длительно выдерживая препарат при низких температурах. Пе-

ред лиофилизацией раствор фильтровали с помощью системы Stericup® GP, при этом потери ЛВ на полизифирсульфоновом фильтре составили не более 3 %. Стерильный раствор дозировали по 3 мл во флаконы вместимостью 20 мл. Количественное содержание ЛХС-1269 во флаконе – 15 мг.

В процессе замораживания раствора ЛХС-1269 установлены 2 точки эвтектики препарата – на уровне –4,5 и 8,5 °C. В результате сублимационного высушивания был получен лиофилизат светло-желтого цвета. Регидратацию проводили водой для инъекций и водно-спиртовым раствором. Установлено, что прозрачный раствор получается при использовании водно-спиртового раствора с концентрацией спирта этилового 10 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана модель лекарственной формы оригинального производного индолокарбазола ЛХС-1269 с использованием технологии ТД в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций. Подобрана оптимальная композиция вспомогательных компонентов и установлены технологические параметры процесса получения ИЛФ ЛХС-1269. В качестве растворителя лиофилизата был выбран водно-спиртовой раствора с концентрацией спирта этилового 10 %.

Полученная модель ИЛФ передана для биологических исследований в лабораторию экспериментальной химиотерапии Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Разработанный подход может послужить основой при создании ИЛФ иных гидрофобных производных индолокарбазола, а также соединений, имеющих сходные свойства.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Киселева М.П., Покровский В.С., Татарский В.В., Борисова Л.М., Голубева И.С., Эктова Л.В. Производные индолокарбазолов – перспективный класс противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(4):20–26. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-20-26.
2. Козин Д. А., Шпрах З. С., Решетняк В. Ю., Нестерова О. В., Аверцева И. Н., Родионова Г. М. Производные индоло[2,3-*a*]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135.
3. Голубева И.С., Еремина В.А., Моисеева Н.И., Эктова Л.В., Яворская Н.П. Производное класса N-гликозидов индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дионов – N-[12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-6-ил]пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ на изобретение RU 2667906 C1. 25.09.2018. Доступно по: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37360265>. Ссылка активна на 02.03.2022.
4. Shprakh Z. S., Budko A. A., Kozin D. A., Ektova L. V., Gusev D. V., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269. *Pharmacia*. 2021;68(2):427–31. DOI: 10.3897/pharmacia.68.e63457.
5. Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):442–53. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.07.003.
6. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятыян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(2):52–59.
7. Силаева С. Ю., Беленова А. С., Сливкин А. И., Чупандина Е. Е., Нарышкин С. Р., Краснюк И. И. Применение твердых дисперсных систем в фармации. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2020;22(2):173–181. DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820.
8. Dmitrieva M. V., Kolpaksidi A. P., Orlova O. L., Ignatyeva E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Krasnyuk I. I. Development of a technology for producing a stable injectable dosage form of a hydrophobic indolocarbazole derivative. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(6):232–235. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i6.42685.
9. Nair A. R., Lakshman Y. D., Anand V. S. K., Sree K. S. N., Bhat K., Dengale S. J. Overview of Extensively Employed Polymeric Carriers in Solid Dispersion Technology. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21(8):309. DOI: 10.1208/s12249-020-01849-z.

## REFERENCES

1. Kiseleva M. P., Pokrovsky V. S., Tatarskiy V. V., Borisova L. M., Golubeva I. S., Ektova L. V. Indolocarbazole derivatives – a promising class of anticancer drugs. *Russian journal of biotherapy*. 2018;4:20–6. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-20-26.
2. Kozin D. A., Shprakh Z. S., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Averseva I. N., Rodionova G. M. Indolo[2,3-*a*]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation. *Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135.
3. Golubeva I. S., Eremina V. A., Moiseeva N. I., Ektova L. V., Yavor-skaya N. P. A derivative of the N-glycoside class of indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazol-5,7-diones – N-[12-(β-D-xylopyranosyl)-5,7-dioxa-indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazol-6-yl]pyridin-2-carboxamide, which has cytotoxic and antitumor activity. Patent RUS RU 2667906 C1. 25.09.2018. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37360265> Accessed: 02.03.2022. (In Russ.)
4. Shprakh Z. S., Budko A. A., Kozin D. A., Ektova L. V., Gusev D. V., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269. *Pharmacia*. 2021;68(2):427–31. DOI: 10.3897/pharmacia.68.e63457.
5. Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):442–53. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.07.003.
6. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavrukhin N. I., Bunyatyan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Drug development & registration*. 2016;(2):52–59. (In Russ.)
7. Silaeva S. Y., Belenova A. S., Slivkin A. I., Chupandina E. E., Naryshkin S. R., Krasnyuk I. I. Application of solid dispersed systems in pharmacy. *Condensed Matter and Interphases*. 2020;22(2):173–181. (In Russ.) DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820.
8. Dmitrieva M. V., Kolpaksidi A. P., Orlova O. L., Ignatyeva E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Krasnyuk I. I. Development of a technology for producing a stable injectable dosage form of a hydrophobic indolocarbazole derivative. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(6):232–235. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i6.42685.
9. Nair A. R., Lakshman Y. D., Anand V. S. K., Sree K. S. N., Bhat K., Dengale S. J. Overview of Extensively Employed Polymeric Carriers in Solid Dispersion Technology. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21(8):309. DOI: 10.1208/s12249-020-01849-z.



Оригинальная статья / Research article

## Глубокие эвтектические растворители на основе холина хлорида как перспективные экстрагенты флавоноидов из седативной растительной композиции

М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина<sup>✉</sup>

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Прожогина Юлия Эдуардовна. E-mail: yulia-pro93@mail.ru

ORCID: М. А. Джавахян – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; Ю. Э. Прожогина – <https://orcid.org/0000-0003-4803-5133>.

Статья поступила: 18.07.2022

Статья принята в печать: 20.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Глубокие эвтектические растворители [ГЭР, deep eutectic solvents (DESS)] сегодня являются объектом пристального внимания научного сообщества различных областей, таких как химия, биология, фармация, биотехнология. Сфера применения ГЭР широко варьирует, и одной из них является извлечение биологически активных веществ из растительного сырья.

**Цель.** Целью настоящей работы было изучить возможность экстракции флавоноидов из растительного сырья посредством глубоких эвтектических растворителей на основе холина хлорида, 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 ГЭР на основе холина хлорида в качестве акцептора водородной связи.

**Результаты и обсуждение.** В данной работе были исследованы ГЭР на основе холина хлорида на предмет способности к извлечению флавоноидов из лекарственного сбора растительной композиции на основе травы пустырника, травы зверобоя, травы мелиссы и травы чабреца, обладающей седативным действием. Также было изучено влияние содержания воды в составе ГЭР на свойства экстрагента. Количество определение флавоноидов в пересчете на рутин проводилось методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны  $410 \pm 2$  нм. Максимальный выход флавоноидов был достигнут при использовании 50%-го водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 при температуре экстракции 60 °C.

**Заключение.** Извлекающая способность полученного ГЭР по эффективности экстракции флавоноидов превышает экстрагирующие характеристики классического экстрагента для исследуемой композиции – 70%-го этилового спирта. Дальнейшее изучение свойств полученного экстрагента, его физических, химических, токсикологических характеристик – задача будущих экспериментов.

**Ключевые слова:** глубокие эвтектические растворители (ГЭР), флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия, пустырник, зверобой, мелисса, чабрец, холина хлорид

**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, провела анализ полученных результатов. Ю. Э. Прожогина разработала технологию получения эвтектических растворителей, выполнила экстракцию, провела контроль качества. Все авторы приняли участие в обсуждении результатов и подготовке статьи.

**Для цитирования:** Джавахян М. А., Прожогина Ю. Э. Глубокие эвтектические растворители на основе холина хлорида как перспективные экстрагенты флавоноидов из седативной растительной композиции. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4):79–86. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-79-86>

## Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents as Promising Extractants of Flavonoids from Sedative Plant Composition

Marina A. Dzhavakhyan, Yulia E. Prozhogina<sup>✉</sup>

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Yulia E. Prozhogina. E-mail: yulia-pro93@mail.ru

ORCID: Marina A. Dzhavakhyan – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; Yulia E. Prozhogina – <https://orcid.org/0000-0003-4803-5133>.

Received: 18.07.2022

Revised: 20.09.2022

Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** Nowadays deep eutectic solvents (DESS) are the object of close attention of the scientific community in various fields, such as chemistry, biology, pharmacy, biotechnology. The areas of application of DESS vary widely, and one of them is the extraction of biologically active substances from plant raw materials.

**Aim.** The aim of this work was to study the possibility of extraction of flavonoids from plant raw materials with using of deep eutectic solvents based on choline chloride, 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. DESs based on choline chloride as hydrogen bond acceptor were used as extractants.

**Results and discussion.** In this article, DESs based on choline chloride were investigated for the ability to extract flavonoids from the medicinal collection of a plant composition based on leonurus grass, hypericum grass, melissa grass and thyme grass, which has a sedative effect. The influence of the water content in DES solutions on the properties of the extractant was also studied. Quantitative determination of flavonoids in terms of rutin was carried out by differential spectrophotometry at a wavelength of  $410 \pm 2$  nm. The maximum yield of flavonoids was achieved by using a 50 % aqueous solution of DES based on choline chloride, glucose and water in a molar ratio of 2:1:1 at an extraction temperature of 60 °C.

**Conclusion.** The extracting ability of the obtained DES in terms of the efficiency of flavonoid extraction exceeds the extracting characteristics of the classical extractant for the composition under study – 70 % ethanol. Further study of the properties of the obtained extractant, its physical, chemical, and toxicological characteristics is the task of future experiments.

**Keywords:** deep eutectic solvents (DESs), flavonoids, differential spectrophotometry, motherwort, John's wort, lemon balm, thyme, choline chloride

**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, analyzed the results. Yulia E. Prozhogina developed technologies for obtaining eutectic solvents, performed extraction, carried out quality control. All authors took part in the discussion of the results and preparation of the article.

**For citation:** Dzhavakhyan M. A., Prozhogina Yu. E. Choline chloride based deep eutectic solvents as promising extractants of flavonoids from sedative plant composition. *Drug development & registration.* 2022;11(4):79–86. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-79-86>

## ВВЕДЕНИЕ

Лекарственное растительное сырье – богатый и необыкновенно ценный источник веществ, оказывающих определенное воздействие на организм человека и обладающих различной терапевтической активностью. Компоненты фитохимического профиля, такие как флавоноиды, алкалоиды, дубильные вещества, различные гликозиды, стероиды и терпеноиды, которые содержатся в листьях и стеблях, плодах и семенах, корнях, цветках и других частях различных растений, представляют собой природные субстанции, которые в дальнейшем могут быть использованы для разработки и создания на их основе лекарственных препаратов различного терапевтического действия.

Одним из наиболее распространенных и эффективных методов получения биологически активных веществ (БАВ) из растительного материала является **экстракция**. Спектр применяемых экстрагентов сегодня обширен, но наиболее распространенными являются органические растворители, в частности этиловый спирт различной концентрации [1]. Однако стоит отметить существенные недостатки этанола в качестве экстрагента: он летуч, взрыво- и пожароопасен, подлежит предметно-количественному учету. Поэтому поиск новых экстрагентов для извлечения БАВ из растительного материала является актуальной задачей фармацевтической отрасли.

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) в научном сообществе впервые были представлены в 2011 г. [2]. Данные соединения были описаны как особый класс жидкостей, которые присутствуют в живых клетках, но в то же время отличаются от воды и жироподобных веществ. ГЭР играют важную роль в жизнедеятельности растений в качестве альтернативной среды для биосинтеза, хранения и транспорта различных биологически активных соединений. Существуют также предположения, что ГЭР необходимы для поддержания метаболизма растительной клетки в условиях недостатка воды или ее недоступности, например в периоды засухи, холода, а также других экстремальных условий [2]. ГЭР представляют собой смеси из соединений, которые имеют гораздо более низкую температуру плавления, чем у любого из отдельных компонентов. Данное уникальное свойство обеспечивается формированием межмолекулярных водородных связей [3] между составными компонентами.

ГЭР привлекают к себе повышенное внимание представителей научного мира не только из-за своих особенных физико-химических свойств (низкая температура плавления, малая летучесть, химическая и термическая стабильность, невоспламеняемость), но и из-за их устойчивых «зеленых» характеристик [3] и экологичности. Они просты в изготовлении, способны к биологическому разложению и биосовместимы с полярными и неполярными соединениями [4–7].

Трудностью, с которой приходится сталкиваться при работе с ГЭР, является их высокая вязкость, но она может быть изменена путем разбавления чистых ГЭР водой [8]. Таким образом, ГЭР могут использоваться при экстракции биологически активных соединений из растительных компонентов. Так, на данный момент уже представлены работы по извлечению фенилпропаноидов из *Rhodiola rosea* L. [9], флоротанинов из *Fucus vesiculosus* [10] с использованием ГЭР; данные экстрагенты пригодны для одновременного извлечения гидрофильных и гидрофобных веществ [11].

Отдельно стоит упомянуть про профиль токсичности ГЭР. Несмотря на то, что они могут включать природные компоненты, некоторые из веществ могут быть токсичны для человека и животных. Например, щавелевая кислота, являющаяся высокоопасным веществом, способна образовывать эвтектические смеси, но применение таких ГЭР небезопасно. Более того, даже те глубокие эвтектические растворители, которые исходно содержат нетоксичные соединения, могут проявлять совершенно новые свойства. Так, было показано, что оценку безопасности ГЭР нельзя осуществлять на основании анализа его составных компонентов, простого суммирования профиля токсичности входящих в состав ГЭР веществ; в некоторых случаях токсичность ГЭР превосходит сумму токсикологических характеристик отдельных субстанций [12]. Также показано, что степень токсичности ГЭР зависит от вязкости [13]. Все это говорит о природе ГЭР как совершенно новой, особой структуры со своими свойствами.

Несомненно, можно утверждать, что изучение глубоких эвтектических растворителей, их уникальных характеристик и возможных сфер применения – новое и стремительно развивающееся направление современной науки.

Ранее в предыдущих работах [14, 15] мы изучали глубокие эвтектические растворители различного состава на экстрагирующую способность флавоноидов из растительной композиции седативного действия. Однако некоторые из применяемых нами веществ (щавелевая кислота, ПЭГ-400, глицерин, пропиленгликоль) при дальнейшем рассмотрении на предмет применения в составе ГЭР показали свою несостоительность. Так, ПЭГ-400, глицерин и пропиленгликоль трудноотделимы от экстрагированных биологически активных веществ, они практически не поддаются отгонке, а извлечения – очистке традиционными методами и, что наиболее важно, они не являются безопасными для человека и обладают токсическим действием на организм. Более того, ГЭР на основе щавелевой кислоты трудны в получении, неустойчивы (кристаллы щавелевой кислоты выпадают в осадок), но, что является наиболее значимым фактором, щавелевая кислота крайне токсична, даже малые ее дозы оказывают повреждающее действие на организм человека, и ее применения следует избегать. Именно поэтому целью нашей дальнейшей работы стал поиск нового ГЭР для извлечения флавоноидов из оригинального седативного сбора. В качестве ак-

цептора протонов был выбран холина хлорид. Холина хлорид запрещен в качестве добавки в пищевую и косметическую продукцию, но по данным литературы обладает высоким потенциалом к образованию экспериментальных эвтектических смесей.

## 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 Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Данный сбор обладает седативными свойствами благодаря содержанию флавоноидов [16], основным из которых является рутин, что было доказано валидированными методами.

### Материалы и реагенты

Холина хлорид (M<sub>r</sub> = 139,62), молочная кислота (M<sub>r</sub> = 90,08), глюкоза (M<sub>r</sub> = 180,16), фруктоза (M<sub>r</sub> = 180,16), мочевина (M<sub>r</sub> = 60,07) и порошок рутина (≥94,0 %) предоставлены компанией Sigma Aldrich (Китай), алюминия хлорид получен от PanReac AppliChem (Испания), спирт этиловый 96 % (ООО «Константа-Фарм М», Россия), кислота уксусная ледяная (ООО ТД «АльфаХим», Россия).

### Изготовление глубоких эвтектических растворителей

Глубокие эвтектические растворители были изготовлены с помощью теплового метода: компоненты смешивали в определенных соотношениях по количеству вещества (согласно мольным концентрациям), смеси в стеклянной конической колбе закрывали пробкой и нагревали на водяной бане при температуре 60 °C и постоянном перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 1000 оборотов в минуту до тех пор, пока не образовывалась прозрачная жидкость однородной структуры, сохраняющая стабильность при комнатной температуре.

В результате эксперимента было получено 4 ГЭР различного состава, приведенного в таблице 1. Все они представляют собой жидкости, однако их вязкость, степень прозрачности и цвет различаются.

### Экстракция флавоноидов из сбора растительной композиции

В качестве объекта исследования была выбрана седативная композиция, состоящая из разных видов лекарственного растительного сырья.

**Таблица 1. Состав глубоких эвтектических растворителей**

**Table 1. Composition of deep eutectic solvents**

Название Name	Компонент Component			Мольное соотношение Molar ratio	Описание Description
	1	2	3		
ГЭР 1 DES 1	Холина хлорид Choline chloride	Молочная кислота Lactic acid	–	1:2	Прозрачная жидкость желто-оранжевого цвета Transparent yellow-orange liquid
ГЭР 2 DES 2	Холина хлорид Choline chloride	Глюкоза Glucose	Вода H <sub>2</sub> O	2:1:1	Прозрачная жидкость светло-желтого цвета Transparent liquid of light yellow color
ГЭР 3 DES 3	Холина хлорид Choline chloride	Мочевина Urea	–	1:2	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid
ГЭР 4 DES 4	Холина хлорид Choline chloride	Фруктоза Fructose	Вода H <sub>2</sub> O	2:1:1	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета Transparent liquid of light brown color

Экстракция флавоноидов из растительного сбора осуществлялась согласно следующей методике:

Около 2 г (точная навеска) исследуемой растительной композиции помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл определенного экстрагента. Колбу закрывали пробкой, нагревали при температуре 60 °C в течение 60 мин при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки со скоростью вращения магнитного якоря 1000 оборотов в минуту. После окончания экстракции колбу охлаждали до комнатной температуры, полученное извлечение фильтровали для дальнейшего анализа.

### Условия экстрагирования

Все извлечения на основе ГЭР были получены в одинаковых условиях: отношение сырье:экстрагент 1:15 г/мл, время экстракции 60 мин, температура экстракции 60 °C.

### Количественное определение

Для количественного определения действующих веществ (суммы флавоноидов в пересчете на рутин) в полученных извлечениях мы использовали метод дифференциальной спектрофотометрии. В основе данного аналитического метода лежит химическая реакция комплексообразования между ионами металла (алюминия Al<sup>3+</sup>) и активными группами молекулы флавоноидов. Образуется хелатный комплекс с максимальной полосой поглощения при длинах волн 390–410 нм, и это дает возможность оценить концентрацию биологически активных веществ по оптической плотности растворов в данной конкретной области спектра.

К раствору изучаемого извлечения добавляли 5%-й раствор алюминия хлорида в 70%-м этиловом спирте. В результате чего образовывался оптически активный окрашенный комплекс с максимумом поглощения на длине волны 410 ± 2 нм, что совпадает с максимумом поглощения стандартного раствора рутина. Данное обстоятельство и определило выбор

вышеприведенной длины волны как характеристической для полученных на основе ГЭР извлечений.

Измерения оптической плотности были выполнены на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

### Статистический анализ

Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистическую обработку осуществляли с использованием программного пакета STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Статистически значимыми признались различия при  $p < 0,05$ .

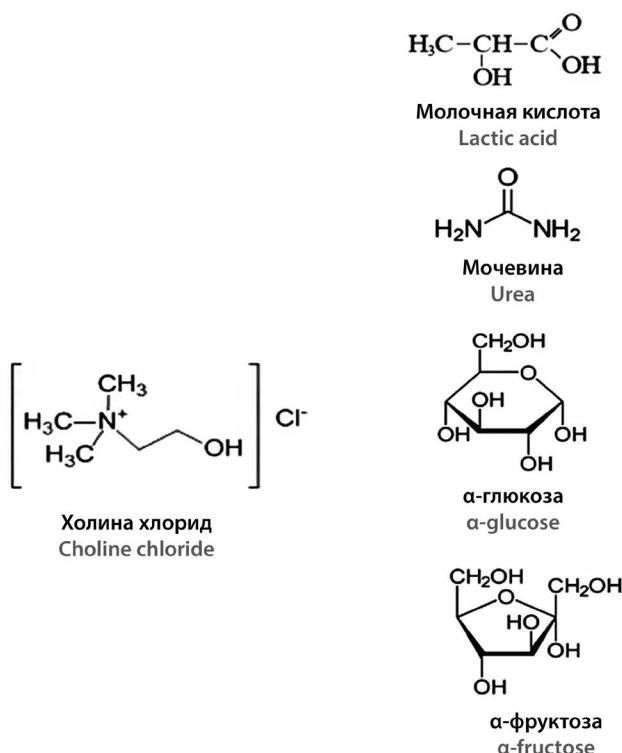
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние состава ГЭР на процесс экстракции флавоноидов

Влияние состава ГЭР на эффективность экстракции БАВ из растительной композиции седативного действия была продемонстрирована проведенным экспериментом. Вязкость изготовленных ГЭР снижена их разбавлением 50 % воды в массовом отношении. В качестве акцептора протона во всех используемых ГЭР выступал холина хлорид.

Как было продемонстрировано ранее [17], экстрагирующая способность ГЭР зависит от их состава, в частности от определенного донора протонов. Одним из многочисленных факторов, влияющих на свойства образующегося ГЭР, является способность одного из его компонентов отдавать H<sup>+</sup>. Это зависит от химической структуры молекулы определенного вещества. Структурные формулы компонентов ГЭР представлены на рисунке 1.

Другим немаловажным фактором является pH образующегося ГЭР. Целевые экстрагируемые соединения – флавоноиды. Данные вещества с химической точки зрения являются гидроксипроизводными флавона. Флавоны с восстановленной карбонильной группой (флавонолы), за счет наличия свободных фенольных гидроксильных групп, обладают слабыми кислотными свойствами, следовательно, они хорошо растворимы в растворах щелочей. Из этого следует, что ГЭР, имеющие большее значение pH (менее кис-



**Рисунок 1.** Структурные формулы компонентов ГЭР, используемых в данной работе

**Figure 1.** Structural formulas of DESs components used in this work

лую среду), должны эффективнее извлекать флавоноиды из растительного материала. Таким образом, ГЭР, сочетающий в себе оптимальные физико-химические свойства, сбалансированные характеристики

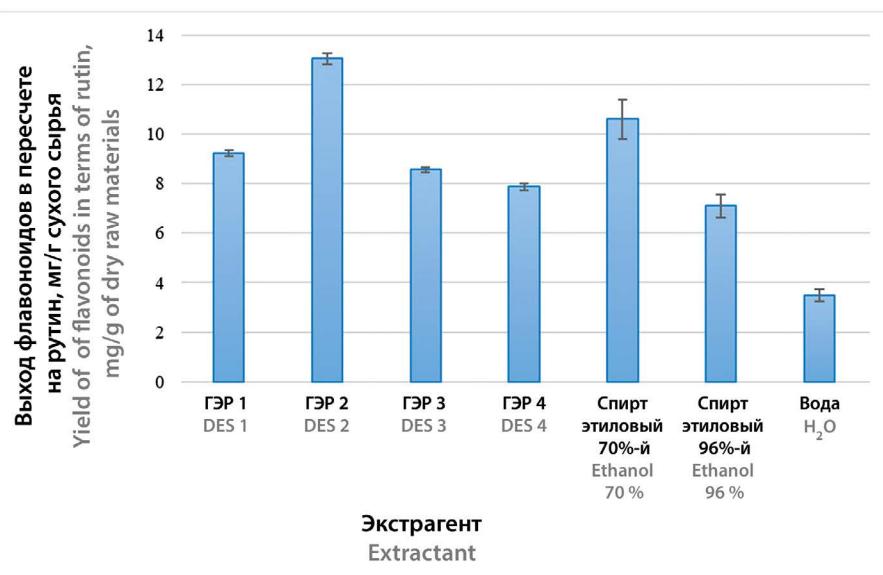
кислотности среды и способности к отдаче протонов, будет являться наилучшим экстрагентом для выбранной растительной композиции.

Как видно из результатов проведенного эксперимента (таблица 2, рисунок 2), оптимальным экстрагентом для извлечения флавоноидов из седативной растительной композиции является ГЭР 2, состоящий из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1. 50%-й водный раствор данного ГЭР способен извлечь 13,04 ± 0,23 мг/г сухого сырья флавоноидов в пересчете на рутин, что составляет 123 % от содержания флавоноидов в водно-этанольном (70 %) извлечении, взятом в качестве стандарта.

**Таблица 2.** Влияние состава ГЭР на выход флавоноидов

**Table 2.** The effect of the DES composition on the yield of flavonoids

Включенный ГЭР Included DES	Выход флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г сухого сырья) Extracted amount of flavonoids in terms of rutin (mg/g of dry raw materials)
ГЭР 1 DES 1	9,22 ± 0,13
ГЭР 2 DES 2	13,04 ± 0,23
ГЭР 3 DES 3	8,57 ± 0,11
ГЭР 4 DES 4	7,87 ± 0,15
Спирт этиловый 70%-й Ethanol 70 %	10,60 ± 0,80
Спирт этиловый 96%-й Ethanol 96 %	7,10 ± 0,46
Вода H <sub>2</sub> O	3,50 ± 0,24



**Рисунок 2.** Содержание флавоноидов (мг/г), экстрагируемых из растительного сбора с помощью 50%-х водных растворов ГЭР (м/м)

**Figure 2.** The content of flavonoids (mg/g) extracted from plant collection with 50 % aqueous solutions of DES (m/m)

## Влияние содержания воды в составе растворителя на эффективность экстракции БАВ

В связи с тем, что образовавшиеся ГЭР обладают высокой вязкостью, они не могут в нативном виде быть использованы в качестве экстрагента биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья из-за ограничения смачивания компонентов жидкостью и малой скорости диффузии. На основании этого нами были изготовлены водные растворы наиболее оптимального экстрагента – ГЭР 2 – различного соотношения эвтектический растворитель:вода (по массе) и исследованы на предмет способности к извлечению БАВ из растительной седативной композиции.

Как видно из результатов эксперимента, с разбавлением ГЭР до определенного значения эффективность экстракции возрастает. Данный феномен можно объяснить уменьшением вязкости растворителя, ведь согласно уравнению Стокса – Эйнштейна:

$$D = kT/6\pi\eta R,$$

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

С уменьшением вязкости скорость диффузии возрастает.

Но при последующем добавлении воды можно наблюдать резкое снижение экстрагирующей способности раствора ГЭР, что связано с разрушением надмолекулярной структуры ГЭР и разрывом водородных связей между донором и акцептором  $\text{H}^+$ .

Результаты зависимости экстрагирующей способности ГЭР от процентного содержания воды в экстрагенте представлены на рисунке 3 и отражены в таблице 3.

Как видно из проведенного эксперимента, оптимальное содержание воды в составе растворителя – 50 %.

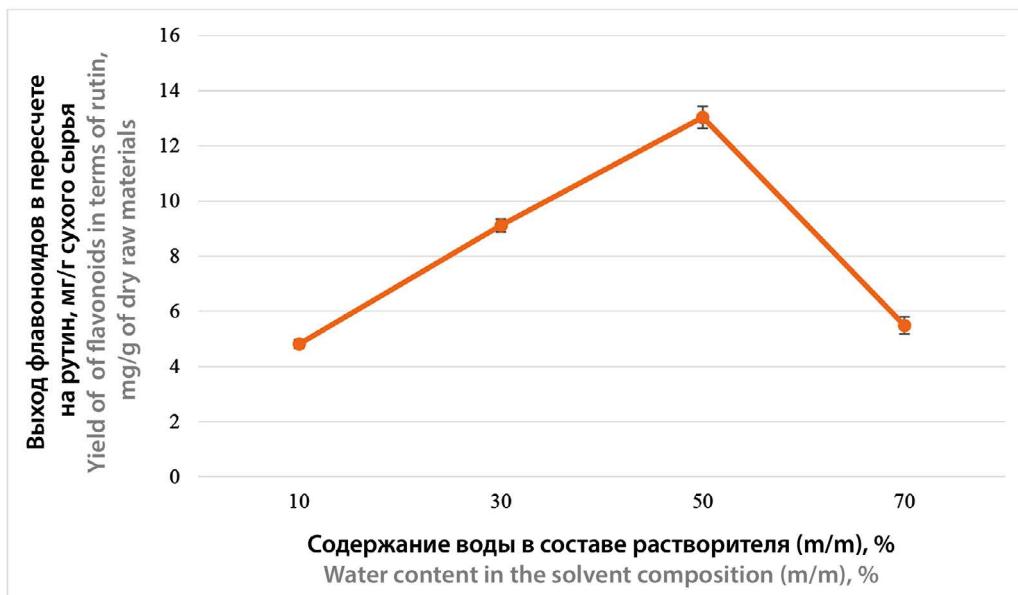
**Таблица 3. Влияние содержания воды в составе растворителя на выход flavonoидов**

**Table 3. Effect of the water content in the solvent composition on the yield of flavonoids**

Включенный ГЭР Included DES	Содержание воды в составе растворителя (м/м), % Water content in the solvent composition (m/m), %	Выход flavonoидов в пересчете на rutin (мг/г сухого сырья) Extracted amount of flavonoids in terms of rutin (mg/g of dry raw materials)
ГЭР 2 (холина хлорид, глюкоза, вода) DES 2 (choline chloride, glucose, $\text{H}_2\text{O}$ )	10	4,81 ± 0,16
	30	9,11 ± 0,23
	50	13,04 ± 0,4
	70	5,49 ± 0,31

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы нами было получено 4 глубоких эвтектических растворителя на основе холина хлорида как акцептора протонов. В качестве наиболее эффективного экстрагента flavonoидов из сбора растительной композиции седативного действия, состоящей из травы пустырника, травы зверо-



**Рисунок 3. Зависимость извлекающей способности ГЭР 2 от содержания воды**

**Figure 3. Dependence of the extracting capacity of DES 2 on the water content**

боя, травы мелиссы и травы чабреца, был выбран ГЭР, состоящий из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1. Изучение влияния содержания воды в составе экстрагента на процесс экстракции позволило установить оптимальную вязкость данного растворителя. Количество содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в полученном извлечении составило 13,04 мг/г сухого сырья, что превышает выход флавоноидов при классическом методе экстракции 70%-м этиловым спиртом (10,6 мг/г сухого сырья). На основании вышесказанного можно прийти к заключению, что новый способ извлечения флавоноидов из растительного сырья перспективен. Однако ввиду того, что свойства и токсикологический профиль ГЭР изучены крайне мало (так, например, уже были продемонстрированы токсические эффекты ГЭР на основе холина хлорида и глюкозы, холина хлорида и фруктозы [13], холина хлорида и мочевины [18] в моделях на животных), необходимо дальнейшее исследование данного уникального класса экстрагентов, которые пока не могут применяться без дальнейшего отделения экстрагента от целевых соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abubakar A. R., Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2020;12:1–10. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS\_175\_19.
2. Choi Y. H., van Spronsen J., Dai Y., Verberne M., Hollmann F., Arends I. W. C. E., Witkamp G.-J., Verpoorte R. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology.* 2011;156(4):1701–1705. DOI: 10.1104/pp.111.178426.
3. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta.* 2013;766:61–68. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
4. Castro V. I. B., Mano F., Reis R. L., Paiva A., Rita A., Duarte C. Synthesis and Physical and Thermodynamic Properties of Lactic Acid and Malic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data.* 2018; 63(7):2548–2556. DOI: 10.1021/acs.jced.7b01037.
5. Mulia K., Adam D., Zahrina I., Krisanti E. A. Green extraction of palmitic acid from palm oil using betaine-based Natural Deep Eutectic Solvents. *International Journal of Technology.* 2018;9(2):335–344. DOI: 10.14716/ijtech.v9i2.1008.
6. Dai Y., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* 2015;187:14–19. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.123.
7. Craveiro R., Aroso I., Flammia V., Carvalho T., Viciosa M. T., Dionísio M., Barreiros S., Reis R. L., Duarte A. R. C., Paiva A. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* 2016;215:534–540. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.01.038.
8. Savi L. K., Carpiné D., Waszcynskyj N., Ribani R. H., Haminiuk C. W. I. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria.* 2019;488:40–47. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.01.025.
9. Shikov A. N., Kosman V. M., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Elameen A., Pozharitskaya O. N. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Phenyletanes and Phenylpropanoids of Rhodiola rosea L. *Molecules.* 2020;25:1826. DOI: 10.3390/molecules25081826.
10. 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;53:243–247. DOI: 10.1007/s11094-019-01987-0.
11. Obluchinskaya E. D., Pozharitskaya O. N., Zakharova L. V., Daurtseva A. V., Flisyuk E. V., Shikov A. N. Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from *Fucus vesiculosus*. *Molecules.* 2021;26:4198. DOI: 10.3390/molecules26144198.
12. Hayyan M., Looi C. Y., Hayyan A., Wong W. F., Hashim M. A. In vitro and in vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0117934. DOI: 10.1371/journal.pone.0117934.
13. Mbous Y. P., Hayyan M., Wong W. F., Looi C. Y., Hashim M. A. Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci. Rep.* 2017;7:41257. DOI: 10.1038/srep41257.
14. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83.
15. Prozhogina Y. E., Dzhavakhyan M. A. Natural deep eutectic solvents as alternative flavonoid extractants from the sedative plant composition. From Plant Biochemistry to Human Biochemistry: International scientific conference. Moscow. June 16–17, 2022. Moscow: "All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants"; 2022. 289–295. DOI: 10.52101/9785870191041\_289.
16. 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.
17. Liu Y., Friesen J. B., McAlpine J. B., Lankin D. C., Chen S. N., Pauli G. F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod.* 2018;81(3):679–690. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.
18. Jung D., Jung J., Kang S., Li K., Hwang I., Jeong J. H., Kim H. S., Lee J. Toxicometabolomics study of a deep eutectic solvent comprising choline chloride and urea suggests in vivo toxicity involving oxidative stress and ammonia stress. *Green Chem.* 2021;23:1300–1311. DOI: 10.1039/D0GC03927F.

## REFERENCES

1. Abubakar A. R., Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2020;12:1–10. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS\_175\_19.
2. Choi Y. H., van Spronsen J., Dai Y., Verberne M., Hollmann F., Arends I. W. C. E., Witkamp G.-J., Verpoorte R. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology.* 2011;156(4):1701–1705. DOI: 10.1104/pp.111.178426.
3. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta.* 2013;766:61–68. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
4. Castro V. I. B., Mano F., Reis R. L., Paiva A., Rita A., Duarte C. Synthesis and Physical and Thermodynamic Properties of Lactic Acid and Malic Acid-Based Natural Deep Eutectic Solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data.* 2018; 63(7):2548–2556. DOI: 10.1021/acs.jced.7b01037.
5. Mulia K., Adam D., Zahrina I., Krisanti E. A. Green extraction of palmitic acid from palm oil using betaine-based Natural Deep Eutectic Solvents. *International Journal of Technology.* 2018;9(2):335–344. DOI: 10.14716/ijtech.v9i2.1008.

6. Dai Y., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y.H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* 2015;187:14–19. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.123.
7. Craveiro R., Aroso I., Flammia V., Carvalho T., Viciosa M.T., Dionísio M., Barreiros S., Reis R.L., Duarte A.R.C., Paiva A. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* 2016;215:534–540. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.01.038.
8. Savi L.K., Carpiné D., Waszczyński N., Ribani R.H., Haminiuk C.W.I. Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria.* 2019;488:40–47. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.01.025.
9. Shikov A.N., Kosman V.M., Flisyuk E.V., Smekhova I.E., Elameen A., Pozharitskaya O.N. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Phenyletanes and Phenylpropanoids of Rhodiola rosea L. *Molecules.* 2020;25:1826. DOI: 10.3390/molecules25081826.
10. 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;53:243–247. DOI: 10.1007/s11094-019-01987-0.
11. Obluchinskaya E.D., Pozharitskaya O.N., Zakharova L.V., Daurtseva A.V., Flisyuk E.V., Shikov A.N. Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from *Fucus vesiculosus*. *Molecules.* 2021;26:4198. DOI: 10.3390/molecules26144198.
12. Hayyan M., Looi C.Y., Hayyan A., Wong W.F., Hashim M.A. In vitro and in vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0117934. DOI: 10.1371/journal.pone.0117934.
13. Mbous Y.P., Hayyan M., Wong W.F., Looi C.Y., Hashim M.A. Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci.Rep.* 2017;7:41257. DOI: 10.1038/srep41257.
14. Dzhavakhyan M.A., Prozhogina Y.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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83.
15. Prozhogina Y.E., Dzhavakhyan M.A. Natural deep eutectic solvents as alternative flavonoid extractants from the sedative plant composition. From Plant Biochemistry to Human Biochemistry: International scientific conference. Moscow. June 16–17, 2022. Moscow: "All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants"; 2022. 289–295. DOI: 10.52101/9785870191041\_289.
16. 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):3–10. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2018-03-01.
17. Liu Y., Friesen J.B., McAlpine J.B., Lankin D.C., Chen S.N., Pauelli G.F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod.* 2018;81(3):679–690. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.
18. Jung D., Jung J., Kang S., Li K., Hwang I., Jeong J.H., Kim H.S., Lee J. Toxicometabolomics study of a deep eutectic solvent comprising choline chloride and urea suggests in vivo toxicity involving oxidative stress and ammonia stress. *Green Chem.* 2021;23:1300–1311. DOI: 10.1039/D0GC03927F.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-87-94>  
УДК 621.039.8



Оригинальная статья / Research article

## Концентрирование рения-188 для синтеза радиофармацевтических препаратов на его основе

А. О. Малышева<sup>✉</sup>, Г. Е. Кодина, Е. А. Лямцева

ФГБУ «Государственный научный центр Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России», 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Малышева Анна Олеговна. E-mail: an-malysheva@yandex.ru

ORCID: А. О. Малышева – <http://orcid.org/0000-0002-9508-2840>; Г. Е. Кодина – <http://orcid.org/0000-0002-3415-4329>; Е. А. Лямцева – <http://orcid.org/0000-0002-8651-9393>.

Статья поступила: 27.10.2021      Статья принята в печать: 22.09.2022      Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Радионуклид рений-188 нашел широкое применение в ядерной медицине для терапии метастатических поражений костной системы и таких заболеваний суставов, как ревматоидные артриты и синовиты. Также разрабатываются лекарственные препараты с целью паллиативного лечения гепатоцеллюлярной карциномы и другие. Сразу после проведения первых клинических исследований препаратов рения-188, когда были получены сведения о клинически эффективных дозировках по активности радионуклида, исключительно актуальным стало использование для синтеза радиофармпрепаратов растворов натрия перрената, <sup>188</sup>Re с высокой объемной активностью и, следовательно, проведение дополнительного концентрирования раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re, получаемого из генератора.

**Цель.** Разработка методики концентрирования раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re, полученного из генератора <sup>188</sup>W/<sup>188</sup>Re «ГРЕН-1» (ГНЦ РФ ФЭИ им. Лейпунского, г. Обнинск, Россия) в лабораторных условиях и сравнение показателей качества полученного продукта и раствора Na<sup>188</sup>ReO<sub>4</sub>, получаемого из генератора с автоматическим модулем концентрирования NEPTIS-TN (IRE, Бельгия).

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовались элюаты отечественных генераторов «ГРЕН-1», и материалы, применяющиеся в производстве и контроле качества этих генераторов, а также генератора производства Национального института радиоэлементов (IRE, Бельгия) с автоматическим модулем концентрирования NEPTIS-TN. Для контроля качества растворов натрия перрената, <sup>188</sup>Re применялись следующие методы: радиометрия, тонкослойная хроматография, потенциометрия, потенциометрическое титрование, атомно-абсорбционная спектроскопия.

**Результаты и обсуждение.** Проведено исследование эффективности концентрирования элюата из генератора «ГРЕН-1» с использованием картриджей, заполненных катионитом Dowex® 50WX8 (100–200 меш) (Sigma-Aldrich, США, кат. № 217506) и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> кисл. с pH 4 (100–200 меш), и генератора IRE с использованием автоматического модуля NEPTIS-TN. Выход по рению-188 после концентрирования составил 75–85 %. В результате процесса концентрирования не происходит пропорционального увеличения содержания химических примесей, и удается получить более чистые растворы по содержанию таких металлов как Fe, Zn, Cu и других. Установлено, что при рутинном использовании генераторов значение объемной активности раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re, полученного в результате концентрирования, не должно превышать 7,4–8,0 ГБк/мл.

**Заключение.** Проведенные исследования показали, что задача концентрирования растворов натрия перрената, <sup>188</sup>Re с высокой объемной активностью надлежащего качества для приготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов для радионуклидной терапии может быть решена с использованием вполне доступных материалов, а именно последовательности картриджей. Применение автоматического модуля более предпочтительно, чем использование ручной сборки последовательности картриджей, исходя из гарантированного обеспечения качества получаемого раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re и снижения дозовой нагрузки на персонал. Однако проведенные исследования показали, что испытанный модуль концентрирования несовместим с отечественным генератором, поэтому предложенная для исследования система не была зарегистрирована в России. Результаты, полученные в настоящей работе, будут использованы для организации промышленного выпуска отечественных модуля и кассет в комплекте с генератором «ГРЕН-1».

**Ключевые слова:** рений-188, радиофармацевтические лекарственные препараты, концентрирование, генератор, контроль качества, радиохимическая чистота

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

**Вклад авторов.** А. О. Малышева, Г. Е. Кодина внесли существенный вклад в концепцию работы, анализ и интерпретация результатов работы. А. О. Малышева, Е. А. Лямцева провели концентрирование и контроль качества растворов рения-188. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Малышева А. О., Кодина Г. Е., Лямцева Е. А. Концентрирование рения-188 для синтеза радиофармацевтических препаратов на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):87–94. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-87-94>

## Concentration of Rhenium-188 for the Radiopharmaceutical Synthesis

Anna O. Malysheva<sup>✉</sup>, Galina E. Kodina, Elena A. Lyamtseva

Federal State Budgetary Institution "State Scientific Center Federal Medical Biophysical Center Named after A. I. Burnazyan of the FMBA of Russia", 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123098, Russia

<sup>✉</sup> Corresponding author: Anna O. Malysheva. E-mail: an-malysheva@yandex.ru

ORCID: Anna O. Malysheva – <http://orcid.org/0000-0002-9508-2840>; Galina E. Kodina – <http://orcid.org/0000-0002-3415-4329>; Elena A. Lyamtseva – <http://orcid.org/0000-0002-8651-9393>.

Received: 27.10.2021      Revised: 22.09.2022      Published: 25.11.2022

© Малышева А. О., Кодина Г. Е., Лямцева Е. А., 2022  
© Malysheva A. O., Kodina G. E., Lyamtseva E. A., 2022

## Abstract

**Introduction.** Rhenium-188 has found wide application in nuclear medicine for the treatment of metastatic lesions of the skeletal system and joint diseases such as rheumatoid arthritis and synovitis. Also,  $^{188}\text{Re}$ -radiopharmaceuticals are being developed for the palliative treatment of hepatocellular carcinoma and others. Immediately after the first clinical trials of  $^{188}\text{Re}$ -radiopharmaceuticals, when information on clinically effective administered doses for radionuclide activity was obtained, the use of sodium perrenate,  $^{188}\text{Re}$  solutions with high volume activity for radiopharmaceutical synthesis and, consequently, additional concentration of obtained from the generator solutions became extremely relevant.

**Aim.** Development of the technique for concentration of sodium perrenate,  $^{188}\text{Re}$  solution, obtained from the  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  generator "GREN-1" (State Research Center of the Russian Federation IPPE named after Leipunsky, Obninsk, Russia) under laboratory conditions, and comparison of the quality indicators of the resulting product and  $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$  solution obtained from the generator with an automatic concentration module NEPTIS-TH (IRE, Belgium).

**Materials and method.** The objects of this study were eluates from the  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  generator "GREN-1" manufactured by the IPPE JSC (Obninsk, Russia) and the materials used in the production and quality control of these generators, as well as the generator produced by the National Institute of Radioelements (IRE, Belgium) with an automatic concentration module NEPTIS-TH. The following methods were used to control the quality of sodium perrenate,  $^{188}\text{Re}$  solutions: radiometry, thin layer chromatography, potentiometry, potentiometric titration, atomic absorption spectroscopy.

**Results and discussion.** The efficiency of concentration of the eluate from the "GREN-1" generator using cartridges filled with cation exchanger Dowex® 50WX8 (100–200 mesh) (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. 217506) and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  with pH 4 (100–200 mesh), and the IRE generator using the automatic NEPTIS-TH module was studied. The yield of rhenium-188 after concentration was 75–85 %. As a result of the concentration process, there is no proportional increase in the content of chemical impurities, and it is possible to obtain cleaner solutions for the content of metals such as Fe, Zn, Cu and others. It was found that in the routine use of generators, the value of the volume radioactivity of the obtained concentrated sodium perrenate,  $^{188}\text{Re}$  solution should not exceed 7.4–8.0 GBq/ml.

**Conclusion.** The conducted studies have shown that the task of concentration of sodium perrenate,  $^{188}\text{Re}$  solutions with high volume activity of appropriate quality for the preparation of radiopharmaceuticals for radionuclide therapy can be solved using quite affordable materials, namely a sequence of cartridges. The use of an automatic module is more preferable than the use of manual assembly of a sequence of cartridges, based on the guaranteed quality assurance of the resulting sodium perrenate,  $^{188}\text{Re}$  solution and reducing the dose burden on personnel. However, the conducted studies have shown that the tested concentration module is incompatible with the domestic generator, so the system proposed for the study was not registered in Russia. The results obtained in this work will be used to organize the industrial production of domestic modules and cassettes in complete set with "GREN-1" generator.

**Keywords:** rhenium-188, radiopharmaceuticals, concentration, generator, quality control, radiochemical purity

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

**Contribution of the authors.** Anna O. Malysheva, Galina E. Kodina made a significant contribution to the concept of the work, analysis and interpretation of work results. Anna O. Malysheva, Elena A. Lyamtseva carried out concentration and quality control of rhenium-188 solutions. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

**For citation:** Malysheva A. O., Kodina G. E., Lyamtseva E. A. Concentration of rhenium-188 for the radiopharmaceutical synthesis. *Drug development & registration.* 2022;11(4):87–94. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-87-94>

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивно развивается радионуклидная терапия (РНТ) – область ядерной медицины, где для лечения применяют открытые источники радионуклидов (РН). Терапевтический эффект достигается за счет воздействия электронного или альфа-излучения РН непосредственно на патологические очаги. Генераторная пара  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  исследуется в течение более 40 лет [1–6] и признана исключительно удобной с точки зрения возможности использования в РНТ: достаточно длительный период полураспада материнского  $^{188}\text{W}$  (64,9 сут.), обеспечивает возможность работы генератора в течение нескольких месяцев; энергия  $\beta^-$ -излучения (максимальная энергия 2,12 МэВ) и период полураспада дочернего  $^{188}\text{Re}$  (16 ч) вполне позволяют реализовать требуемую терапевтическую дозу, не вызывая лишних лучевых нагрузок; при этом за счет наличия  $\gamma$ -излу-

чения  $^{188}\text{Re}$  (155 кэВ) имеется возможность визуализации распределения радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) в организме пациента. Поскольку Re является химическим аналогом Tc, быстро была установлена возможность отделения  $^{188}\text{Re}$  от  $^{188}\text{W}$  аналогично технологиям, которые применялись для выделения  $^{99m}\text{Tc}$  из равновесной смеси его с  $^{99}\text{Mo}$ , то есть с помощью оксида алюминия в хроматографических генераторах [1–5] или путем экстракции метилэтилкетоном (МЭК) [7, 8].

Серьезной проблемой быстрого развития медицинского применения  $^{188}\text{Re}$  стала необходимость получения материнского  $^{188}\text{W}$  требуемой удельной активности только в высокопоточных реакторах. Этим, очевидно, и объясняется, что наиболее важные работы по созданию медицинского варианта генератора  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  проводились первоначально практически только группой под руководством F. F. Knapp в Оак-Риджской национальной лаборатории HFIR ORNL

(High Flux Isotope Reactor Oak Ridge National Laboratory, США), а также в нашей стране, поскольку имелась возможность получения  $^{188}\text{W}$  на высокопоточном (до  $10^{15} \text{ н} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) реакторе ГНЦ – Научно-исследовательский институт атомных реакторов (г. Димитровград, Россия) [9, 10]. Уже в начале 1990-х по инициативе группы F. F. Knapp в сотрудничестве со специалистами Германии был разработан хроматографический генератор [2, 3] (сегодня эти генераторы выпускаются в США и Европе). Практически одновременно выпуск хроматографических генераторов был начат первоначально в Институте ядерной физики АН Узбекистана [11], а позже в ГНЦ – Физико-энергетический институт им. А. И. Лейпунского (г. Обнинск, Россия) [12]. К настоящему времени генераторы производятся в 5 странах мира, и предложено большое количество различных РФЛП с  $^{188}\text{Re}$  для терапии онкологических заболеваний [4, 6, 13, 14], а также технологии, используемые в кардиологии (профилактика рестенозов при коронарном шунтировании) [15], ревматологии (радиосиновэктомия) и других направлениях [16, 17].

Применение препаратов  $^{188}\text{Re}$  в радионуклидной терапии связано с необходимостью использования исходных растворов радионуклида высокой объемной активности. Так, например, при приготовлении РФЛП для выполнения процедуры купирования болевых ощущений при костных метастазах используют раствор натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  с объемной активностью 2–4 ГБк/мл. При внутрисуставном [17] или внутриarterиальном [18] введении РФЛП нужны еще более высокие объемные активности (до 7–8 ГБк/мл) исходных растворов. Обеспечить такую высокую объемную активность в течение длительного времени может только генератор экстракционного типа [8], который используется в качестве регионального централизованного источника  $^{188}\text{Re}$  медицинского назначения. Натрия перренат,  $^{188}\text{Re}$ , экстракционный, раствор для приготовления радиофармацевтических препаратов зарегистрирован в нашей стране в качестве фармацевтической субстанции (ФС 000452071212 в ГРЛС). Максимальная объемная активность такого раствора составляет 6 ГБк/мл на дату и время изготовления. К недостаткам экстракционного генератора нужно отнести то, что он не может быть установлен непосредственно в медицинских учреждениях, поскольку требует присутствия в штате высококвалифицированных специалистов-радиохимиков для обслуживания. Генераторы сорбционного (хроматографического) типа позволяют получать элюат с высокой объемной активностью лишь в течение нескольких недель с начала их эксплуатации в зависимости от номинальной активности  $^{188}\text{W}$ . Например, даже для коммерчески выпускаемых в нашей стране генераторов «ГРЕН-1» (АО «ГНЦ РФ – ФЭИ им. А. И. Лейпунского», г. Обнинск, Россия, зарегистрирован в качестве медицинского изделия: РУ № РЗН 2021/13914)

максимальной номинальной активности по  $^{188}\text{W}$  (40 ГБк) объемная активность элюата по  $^{188}\text{Re}$  на конец срока эксплуатации генераторов (200 сут.) составит 1 ГБк/мл при их элюировании 5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. То есть элюат нельзя использовать даже для одного пациента, хотя для приготовления некоторых препаратов было бы достаточно иметь 2–3 ГБк  $^{188}\text{Re}$  в объеме 1–3 мл. Таким образом, сразу после проведения первых клинических исследований препаратов рения-188, когда были получены сведения о клинически эффективных дозировках РФЛП по активности радионуклида, исключительно актуальным стало проведение дополнительного концентрирования раствора натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$ , получаемого из генератора. Впервые наиболее простой в исполнении метод концентрирования был предложен F. F. Knapp [3], который основан на пропускании раствора элюата через картридж, заполненный сильнокислотным катионитом в  $\text{Ag}^+$ -форме (для очистки элюата от макроскопических количеств хлорид-ионов), с последующим пропусканием полученного раствора через второй картридж, заполненный кислым оксидом алюминия или оксидом кремния (для сорбции перренат-ионов). Десорбцию перренат-ионов проводили 1,0 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Таким образом, после элюирования генератора 10–20 мл 0,9% NaCl удавалось сконцентрировать всю активность  $^{188}\text{Re}$  в объеме 1 мл с выходом порядка 70 %. Большинство последующих публикаций описывают различные модификации этого метода с использованием различных катионитов и анионитов, а также различных элюэнтов как для генератора, так и для элюирования перрената после колонки, содержащей  $\text{Ag}^+$ -катионит [4, 6, 14, 18–22]. Разница заключается в том, что авторы применяют доступные им реагенты и материалы. В большинстве методик на второй стадии применяются промышленно выпускаемые картриджи QMA (анионообменник), после которого раствор  $^{188}\text{Re}$  в 0,9% NaCl через стерилизующий фильтр подается во флакон с продуктом. В 2018 г. группой индийских исследователей был опубликован «Протокол процедуры концентрирования элюата генератора рения-188» [22], описывающий сборку установки для концентрирования с использованием фактически подручных средств – шприцев, разъемов, двухходовых кранов и других устройств, позволяющих получить стерильный продукт, который используют при изготовлении РЛФП с рением-188.

Единственная попытка создания промышленно выпускаемой автоматизированной установки, состоящей из генератора рения-188, соединенного с концентрирующим модулем, который одновременно может обеспечить изготовление конкретного радиофармацевтического препарата, была реализована в Национальном институте радиоэлементов (IRE, Бельгия) [14, 23]. Элюирование и концентрирование  $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$  происходят автоматически: после заверше-

ния элюирования раствор  $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$  подается шприцевым насосом в кассету для концентрирования. Готовый продукт поступает в стерильный флакон для лекарственных средств. По окончании процесса проводится автоматическая очистка установки от жидких радиоактивных отходов. Авторам настоящей работы было предложено освоить приемы работы с такой установкой с целью определения необходимости регистрации ее в нашей стране и последующего импорта. Одновременно представлялась целесообразной разработка собственного метода концентрирования раствора натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$ , полученного из генератора «ГРЕН-1» (рисунок 1, А) с использованием прототипов картриджей для концентрирования, и сравнение показателей качества полученного продукта и раствора  $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ , получаемого из генератора  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  (рисунок 1, Б) с автоматическим модулем концентрирования NEPTIS-TH (IRE, Бельгия).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Картридж с сильнокислотным катионитом в  $\text{Ag}^+$ -форме готовили следующим образом: в стеклянную колонку размером  $10 \times 1,5$  см помещали 4 мл катионита Dowex® 50WX8 (сильнокислотный катионит в  $\text{H}^+$ -форме с размером пор 100–200 меш) (Sigma-Aldrich, США, кат. № 217506). Предварительно на дно колонки помещали стекловолокно, которое препятствует вымыванию сорбента, и промывали дистиллиированной водой для удаления частиц сорбирующего вещества. Для перевода катионита в  $\text{Ag}^+$ -форму через колонку пропускали 20 мл 0,05 М раствора  $\text{AgNO}_3$ , а затем промывали катионит дистиллиированной водой. Картридж для сорбции перренат-ионов готовили следующим образом: на дно стеклянной колонки размером  $10 \times 1,5$  см помещали стекловолокно, а затем

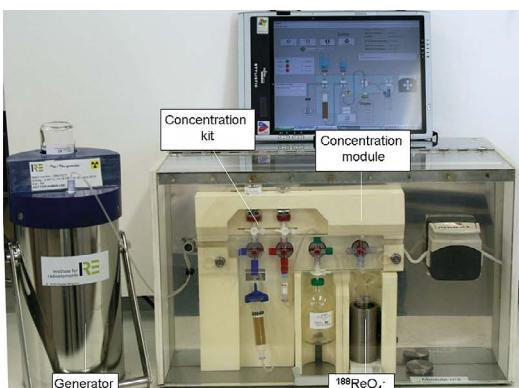
оксид алюминия фирмы Merck KGaA (Германия) (с размером пор 100–200 меш,  $\text{pH} = 4$ ) и уплотняли его. Через подготовленные картриджи со скоростью не более 1 мл/мин пропускали раствор натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  после его элюирования из генератора, при этом перренат-ионы полностью сорбируются на картридже с оксидом алюминия. Десорбцию перренат-ионов проводили 2,0 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия.

Раствор натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  с высокой объемной активностью из генератора  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ , производства Национального института радиоэлементов (IRE, Бельгия), с автоматическим модулем концентрирования NEPTIS-TH получали следующим образом. После установки кассеты концентрирования в модуль и запуска программы, процесс элюирования-концентрирования идет автоматически. 100 мл элюата под действием давления, нагнетаемого компрессором, поступают в кассету для концентрирования. Концентрированный раствор по завершении процесса, который длится 1 ч, автоматически поступает в стерильный флакон. Объем концентрированного раствора элюата задается до начала процесса. Кассета применяется однократно и после каждой процедуры концентрирования требуется ее заменить и утилизировать. Эксперименты по получению концентрированных растворов натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  проводили регулярно при элюировании генераторов каждые 3–4 суток (время максимального накопления  $^{188}\text{Re}$  в генераторе после предыдущего элюирования составляет ~90 ч) в течение нескольких месяцев.

Контроль качества растворов натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$ , полученных в объеме от 0,8 мл до 5 мл с использованием картриджей и автоматического модуля концентрирования, проводили в соответствии с Государственной фармакопеей РФ (ГФ XIV, ОФС.1.11.0001.15 «Радиофармацевтические лекарственные препараты») по следующим показателям: объемная актив-



А  
А



Б  
В

Рисунок 1. Внешний вид генераторов  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ :

А – «ГРЕН-1», Россия; Б – IRE, Бельгия

Figure 1. Appearance of the  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  generators:

А – "GREN-1", Russia; Б – IRE, Belgium

ность, радиохимическая чистота<sup>1</sup>, pH<sup>2</sup>, содержание NaCl<sup>3</sup>, содержание химических примесей<sup>4</sup>.

Измерение активности растворов натрия перрената, <sup>188</sup>Re проводили радиометрическим методом с помощью дозкалибратора РИС-А1 (ООО «НТЦ «Амплитуда», Россия).

Радиохимическую чистоту определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах с тонким слоем силикагеля на алюминиевой подложке (Merck KGaA, Германия, кат. № 5553) в ацетоне х.ч. (ООО ТД «ХИММЕД», Россия). Время разделения 10 мин. В указанных условиях перренат, <sup>188</sup>Re-ионы продвигаются с фронтом растворителя. Детектирование активности на хроматограмме проводили радиометрическим методом с использованием хроматограмм-сканера Гамма-Скан 01А (ООО «НТЦ «Амплитуда», Россия).

Показатель pH растворов натрия перрената, <sup>188</sup>Re определяли потенциометрическим методом с помощью pH-метра S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Швейцария).

Содержание NaCl определяли потенциометрическим титрованием с помощью титратора Easy Cl (Mettler Toledo, Швейцария). 0,2 мл препарата вносили в ячейку для титрования вместимостью 50 мл, добавляли 9,8 мл воды, перемешивали и титровали потенциометрически 0,05 М раствором AgNO<sub>3</sub>, применяя в качестве индикаторного серебряный электрод.

Содержание неактивных примесей в растворе натрия перрената, <sup>188</sup>Re определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией с помощью спектрометра атомно-абсорбционного модификации МГА-915М (ООО «Люмэкс», Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов по концентрированию элюата из генератора «ГРЕН-1» на картриджах было установлено, что потери пер-

<sup>1</sup> Общая фармакопейная статья ОФС.1.11.0001.15 «Радиофармацевтические лекарственные препараты». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М. 2018. Доступно по: <http://pharmacopeia.ru/9d321c9227cf0d38c06435161f5d41b5-1409.html>. Ссылка активна на 30.05.2022.

<sup>2</sup> Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионо-метрия». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М. 2018. Доступно по: <http://pharmacopeia.ru/c1d4da043aaaef5915a91c35d831536-532.html>. Ссылка активна на 30.05.2022.

<sup>3</sup> Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.1.19.0002.15 «Потенциометрическое титрование». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М. 2018. Доступно по: <http://pharmacopeia.ru/c1d4da043aaaef5915a91c35d831536-623.html>. Ссылка активна на 30.05.2022.

<sup>4</sup> Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.1.1.0005.18 «Атомно-абсорбционная спектрометрия». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М. 2018. Доступно по: <http://pharmacopeia.ru/c1d4da043aaaef5915a91c35d831536-768.html>. Ссылка активна на 30.05.2022.

ренат-ионов на катионите в среднем составляли 10–18 %, на колонке с оксидом алюминия – 5–6 %. При этом перренат-ионы полностью переходят в раствор при промывке картриджа 1–2 мл 0,9%-го раствора NaCl. Выход по рению-188 после процесса концентрирования на приготовленных картриджах составлял в целом 75–85 %. Таким образом, использование системы концентрирования, состоящей из картриджа с катионитом Dowex 50WX8 и картриджа с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с pH 4, позволяет получить 1–2 мл раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re с высокой объемной активностью из генератора «ГРЕН-1». В системе концентрирования NEPTIS-TH были получены растворы натрия перрената, <sup>188</sup>Re с выходом от 50 до 80 %.

Основные показатели качества раствора радионуклида, которые могут изменяться при концентрировании – это содержание радионуклидных и химических примесей. Изменение содержания радионуклидных примесей может быть причиной дополнительных лучевых нагрузок в органах, где накопление целевого радионуклида не наблюдается. Применение в составе картриджа концентрирования колонки с оксидом алюминия (сорбент, который применяется для разделения пары <sup>188</sup>W/<sup>188</sup>Re в генераторе рения-188) обеспечивает дополнительную очистку от <sup>188</sup>W с коэффициентом разделения >10<sup>3</sup> [1]. Поэтому значение радионуклидной чистоты ≥99,9 % было получено при анализе всех концентратов по этому показателю. Допустимое содержание неактивных химических примесей в растворах РФЛП строго нормировано, так как примеси могут конкурентно связываться с химическими веществами, входящими в состав РФЛП, что приведет к изменению его радиохимической чистоты и, соответственно, фармакокинетики. Результаты определения качества растворов натрия перрената, <sup>188</sup>Re после их концентрирования приведены в таблице 1. Уровень содержания примесей металлов в пробах после концентрирования обоими методами является вполне допустимым для использования данных элюатов для приготовления РФЛП. Отмечено, что ни при каких условиях не было зафиксировано превышение значений количественного содержания примесей, указанных в нормативной документации производителя генератора. То есть, в целом в результате процесса концентрирования не происходит пропорционального увеличения содержания химических примесей, и удается получить более чистые растворы по содержанию таких металлов как Fe, Zn, Cu и других.

На рисунке 2 представлена типичная радиохроматограмма раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re. Большинство полученных обоими методами концентратов имели РХЧ более 99 %, однако, при концентрировании раствора натрия перрената, <sup>188</sup>Re до относительно высоких значений объемной активности происходит снижение РХЧ элюата, связанное, очевидно, с частичным образованием продуктов радиолиза. Так, на-

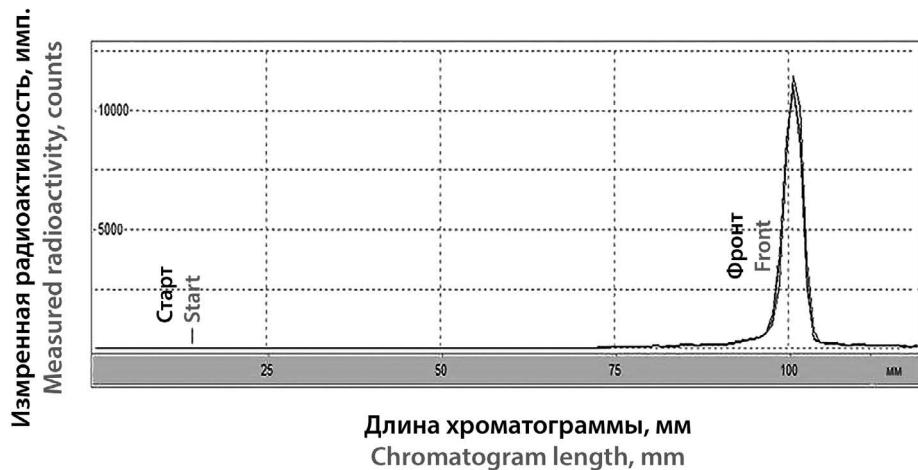
**Таблица 1. Результаты исследования качества растворов натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  после их концентрирования**

**Table 1. Results of the quality study of the sodium perrhenate,  $^{188}\text{Re}$  solutions after concentration**

Объем, мл Volume, mL	Активность, ГБк Activity, GBq	Объемная активность, ГБк/мл Volume activity, GBq/mL	РХЧ, % RCP, %	рН	Выход, % Yield, %	Концентрация NaCl, мг/мл Concentration of NaCl, mg/mL	Концентрация примесей металлов, мкг/мл Concentration of metal impurities, $\mu\text{g}/\text{mL}$					
							Al	Pb	Ni	Fe	Cu	Zn
<i>Технические требования изготовителя генератора «ГРЕН-1» (ТУ 9452-031-08624390-2006)</i> <i>Technical requirements of the manufacturer of the generator "GREN-1" (TU 9452-031-08624390-2006)</i>												
5	37,0	3,7–7,4*	≥99	4,0–8,0	–	9,0 ± 1,0	5,0	0,1	0,1	1,0	0,05	2,5
Предел чувствительности аналитического метода, мкг/мл Limit of sensitivity of the analytical method, $\mu\text{g}/\text{mL}$							0,02	0,002	0,005	0,05	0,0005	0,005
<i>Раствор натрия перрената, <math>^{188}\text{Re}</math> после элюирования из генератора «ГРЕН-1» с последующим концентрированием на картриджах</i> <i>Sodium perrhenate solution, <math>^{188}\text{Re}</math> after elution from the generator "GREN-1" with subsequent concentration on cartridges</i>												
1	0,5	0,5	99,6	5,9	75,3	8,95	<0,02	0,022	<0,001	<0,05	0,0005	<0,001
<i>Раствор натрия перрената, <math>^{188}\text{Re}</math> из генератора с автоматическим модулем концентрирования NEPTIS TH (IRE, Бельгия)</i> <i>Sodium perrhenate solution, <math>^{188}\text{Re}</math> from generator with automatic concentration module NEPTIS TH (IRE, Belgium)</i>												
5	12,2	2,44	99,1	6,2	82,2	8,66	<0,02	<0,002	0,001	<0,05	0,002	0,041
3	2,97	0,99	99,4	6,2	76,7	8,31		0,022	0,004		0,001	0,083
2	10,4	5,2	99,3	6,0	78,1	7,95		0,091	0,001		0,004	0,062
1	8,22	8,22	96,9	6,3	68,2	6,79		0,021	0,003		0,002	0,043
0,8	8,9	11,1	92,1	6,4	76,9	6,60		0,007	0,002		0,001	0,056

**Примечание.**\* При элюировании 5–10 мл.

**Note.**\* When elution 5–10 mL.



**Рисунок 2. Хроматограмма раствора натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  в системе ацетон – силикагель**

**Figure 2. Chromatogram of the sodium perrhenate,  $^{188}\text{Re}$  solution in acetone – silica gel**

пример, при получении концентрата с объемной активностью 8,22 и 11,1 были получены значения РХЧ 96,9 % и 92,1 % соответственно. При этом одновременно наблюдали снижение содержания хлорида натрия в элюатах до значений, не соответствующих требованиям нормативной документации (8–10 мг/мл), что может быть связано с процессами радиолиза в этих растворах. Поэтому при рутинном использова-

нии генератора  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  мы рекомендуем при концентрировании раствора натрия перрената,  $^{188}\text{Re}$  не превышать в полученных концентратах значений объемной активности 7,4–8,0 ГБк/мл (многократно подтвержденный верхний уровень активности элюатов, получаемых в течение многолетних испытаний и эксплуатации генератора «ГРЕН-1»), либо вводить в состав получаемых растворов стабилизаторы.

По показателям «стерильность» и «содержание бактериальных эндотоксинов» все полученные растворы соответствовали требованиям нормативной документации<sup>1</sup>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что применение различных систем концентрирования (последовательности картриджей или автоматического модуля) для получения растворов натрия перрена, <sup>188</sup>Re после элюирования генератора позволяет получать раствор концентрированного элюата объемом 1–3 мл с высокой объемной активностью надлежащего качества для приготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов. Применение автоматического модуля более предпочтительно, чем использование ручной сборки последовательности картриджей, исходя из гарантированного обеспечения качества получаемого элюата и снижения дозовой нагрузки на персонал. Модуль концентрирования NEPTIS-TH предполагалось производить и эксплуатировать в полном соответствии с требованиями надлежащих практик (GMP). Однако оказалось, что стоимость такого модуля с учетом необходимости постоянного применения одноразовых кассет намного превышает стоимость генератора и получаемых препаратов. При этом модуль несовместим с отечественным генератором, поэтому предложенная для исследования система не была зарегистрирована в России. В настоящее время сведений о промышленном выпуске системы генератора рения-188 с модулем концентрирования и кассет для выполнения процесса концентрирования не имеется. Результаты, полученные в настоящей работе, предполагается использовать для организации промышленного выпуска отечественных модуля и кассет в комплекте с генератором «ГРЕН-1».

## ЛИТЕРАТУРА

- Kodina G., Tulskaya T., Gureev E., Brodskaya G., Gapurova O., Drosdovsky B. Production and Investigation of Rhenium-188 generator. In: Nicolini M., Bandoli G., Mazzi U., editors. Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine 3. New York: Cortina International-Verona-Raven Press; 1990. P. 635–641.
- Knapp F. F. Jr., Mirzadeh S. The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1994;21(10):1151–1165. DOI: 10.1007/BF00181073.
- Knapp F. F. Jr. Rhenium-188 – a generator-derived radioisotope for cancer therapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 1998;13(5):337–349. DOI: 10.1089/cbr.1998.13.337.
- Pillai M. R., Dash A., Knapp F. F. Jr. Rhenium-188: availability from the (188)W/(188)Re generator and status of current applications. *Current Radiopharmaceuticals*. 2012;5(3):228–243. DOI: 10.2174/187447101205030228.
- Kodina G. E., Krasikova P. N. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. М.: Изд. дом МЭИ; 2014. 282 с.
- Lepareur N., Lacleuille F., Bouvry C., Hindré F., Garcion E., Chérel M., Noiret N., Garin E., Knapp F. F. Jr. Rhenium-188 Labeled Radiopharmaceuticals: Current Clinical Applications in Oncology and Promising Perspectives. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:132. DOI: 10.3389/fmed.2019.00132.
- Mushtaq A., Bukhari T. H., Khan I. U. Extraction of Medically Interesting <sup>188</sup>Re-Perrhenate in Methyl Ethyl Ketone for Concentration Purposes. *Radiochim Acta*. 2007;95(9):535–537. DOI: 10.1524/ract.2007.95.9.535.
- Цивадзе А. Ю., Филянин А. Т., Романовский В. Н., Зыков М. П., Кодина Г. Е., Малышева А. О., Филянин О. А., Непомнящий О. Н. Экстракционный центробежный генератор <sup>188</sup>Re и радиофармпрепараты на его основе для радионуклидной терапии. *Радиохимия*. 2016;58(5):443–449.
- Ponsard B., Hiltunen J., Vera-Ruiz H., Beets A. L., Mirzadeh S., Knapp F. F. Jr. The Tungsten-188/Rhenium-188 Generator: Effective Coordination of Tungsten-188 Production Between the HFIR and BR2 Reactors. *J Radioanalyt Nucl Chem*. 2003;257:169–174.
- Karelin E. A., Efimov V. N., Filimonov V. T., Kusnetsov R. A., Revakin Y. L., Andreev O. I., Zhemkov I. Y., Buhk V. G., Lebedev V. M., Spiridonov Y. N. Radionuclide Production using a Fast Flax Reactor. *Appl. Radiat. Isot.* 2000;53(4–5):825–827. DOI: 10.1016/S0969-8043(00)00236-0.
- Brodskaya G. A., Gapurova O. U. Development of a High Activity Tungsten-188/Rhenium-188 Generator. *Radiochemistry*. 1993;35(3):325–329.
- Basmonov V., Kolesnik O., Ignatova A. Rhenium-188 Chromatographic Generator and Therapeutic Radiopharmaceutical. *Eur J Nucl Med*. 1998;25:1043.
- Knapp F. F. Continued Availability of the Tungsten-188/Rhenium-188 Generator to Enhance Therapeutic Utility of <sup>188</sup>Re. *International Journal of Nuclear Medicine Research*. 2017;3–15. DOI: 10.15379/2408-9788.2017.02.
- Lepareur N., Garin E., Noiret N., Herry J. Y. A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced <sup>188</sup>Re. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2004;47(12):857–867. DOI: 10.1002/jlcr.863.
- Oh S. J., Moon D. H., Ha H. J., Park S. W., Hong M. K., Park S. J., Choi T. H., Lim S. M., Choi C. W., Knapp F. F. Jr., Lee H. K. Automation of the synthesis of highly concentrated <sup>188</sup>Re-MAG3 for intracoronary radiation therapy. *Applied Radiation and Isotopes*. 2001;54(3):419–427. DOI: 10.1016/S0969-8043(00)00279-7.
- Кодина Г. Е., Малышева А. О., Клементьева О. Е., Лямцева Е. А., Таратоненкова Н. А., Вороницкая Н. Н., Семоненко Н. П., Графскова Т. А. Радиофармацевтическая композиция для радиосинтезомии и способ ее получения. Патент РФ на изобретение № RU 2624237 C1. 03.07.2017. Доступно по: [https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2624237&TypeFile=html](https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2624237&TypeFile=html). Ссылка активна на 31.05.2022.
- Kampen W. U., Boddenberg-Pätzold B., Fischer M., Gabriel M., Klett R., Konijnenberg M., Kresnik E., Lelouche H., Paycha F., Terslev L., Turkmen C., van der Zant F., Antunovic L., Panagiotidis E., Gnanasegaran G., Kuwert T., van den Wyngaert T., The EANM guideline for radiosynoviorthesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2022;49(2):681–708. DOI: 10.1007/s00259-021-05541-7.
- Lepareur N., Ardisson V., Noiret N., Garin E. <sup>188</sup>Re-SSS/Lipiodol: development of a potential treatment for HCC from bench to bedside. *International Journal of Molecular Imaging*. 2012;278306. DOI: 10.1155/2012/278306.
- Guhlike S., Beets A. L., Oetjen K., Mirzadeh S., Biersack H. J., Knapp F. F. Jr. Simple New Method for Effective Concentration of <sup>188</sup>Re Solutions from Alumina-Based <sup>188</sup>W/<sup>188</sup>Re Generator. *J Nucl Med*. 2000;41(7):1271–1278.
- Mansur M. S., Mushtaq A., Jehangir M. Concentration of <sup>99m</sup>Tc-pertechnetate and <sup>188</sup>Re-perrhenate. *Radiochimica Acta*. 2006;94(2):107–111. DOI: 10.1524/ract.2006.94.2.107.

<sup>1</sup> Общая фармакопейная статья ОФС.1.11.0001.15 «Радиофармацевтические лекарственные препараты». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М. 2018. Доступно по: <http://pharmacopeia.ru/9d321c9227cf0d38c06435161f5d41b5-1409.html>. Ссылка активна на 30.05.2022.

21. Argyrou M., Valassi A., Andreou M., Lyra M. Rhenium-188 Production in Hospitals, by W-188/Re-188 Generator, for Easy Use in Radionuclide Therapy. *International Journal of Molecular Imaging*. 2013;290750. DOI: 10.1155/2013/290750.
22. Chhabra A., Rathore Y., Bhusari P., Vatsa R., Mittal B. R., Shukla J. Concentration protocol of rhenium-188 perrhenate eluted from tungsten-188/rhenium-188 generator for the preparation of high-yield rhenium-188-labelled radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine Communications*. 2018;39(10):957–959. DOI: 10.1097/MNM.0000000000000893.
23. Uccelli L., Pasquali M., Boschi A., Giganti M., Duatti A. Automated preparation of Re-188 lipiodol for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011;38(2):207–213. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2010.08.011.
14. Lepareur N., Garin E., Noiret N., Herry J. Y. A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced  $^{188}\text{Re}$ . *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2004;47(12):857–867. DOI: 10.1002/jlcr.863.
15. Oh S. J., Moon D. H., Ha H. J., Park S. W., Hong M. K., Park S. J., Choi T. H., Lim S. M., Choi C. W., Knapp F. F. Jr., Lee H. K. Automation of the synthesis of highly concentrated  $^{188}\text{Re}$ -MAG3 for intracoronary radiation therapy. *Applied Radiation and Isotopes*. 2001;54(3):419–427. DOI: 10.1016/S0969-8043(00)00279-7.
16. Kodina G. E., Malysheva A. O., Klementieva O. E., Lyamtseva E. A., Taratonenkova N. A., Voronitskaya N. N., Seminenko N. P., Grafskova T. A. Radiopharmaceutical composition for radiosynovectomy and method for its preparation. Patent RUS № 2624237 C1. 03.07.2017. Available at: [https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2624237&TypeFile=html](https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2624237&TypeFile=html). Accessed: 31.05.2022. (In Russ.)
17. Kampen W. U., Boddenberg-Pätzold B., Fischer M., Gabriel M., Klett R., Konijnenberg M., Kresnik E., Lelouche H., Paycha F., Terslev L., Turkmen C., van der Zant F., Antunovic L., Panagiotidis E., Gnanasegaran G., Kuwert T., van den Wyngaert T. The EANM guideline for radiosynoviorthesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2022;49(2):681–708. DOI: 10.1007/s00259-021-05541-7.
18. Lepareur N., Ardisson V., Noiret N., Garin E.  $^{188}\text{Re}$ -SSS/Lipiodol: development of a potential treatment for HCC from bench to bedside. *International Journal of Molecular Imaging*. 2012;278306. DOI: 10.1155/2012/278306.
19. Guhlke S., Beets A. L., Oetjen K., Mirzadeh S., Biersack H. J., Knapp F. F. Jr. Simple New Method for Effective Concentration of  $^{188}\text{Re}$  Solutions from Alumina-Based  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  Generator. *J Nucl Med*. 2000;41(7):1271–1278.
20. Mansur M. S., Mushtaq A., Jehangir M. Concentration of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate and  $^{188}\text{Re}$ -perrhenate. *Radiochimica Acta*. 2006;94(2):107–111. DOI: 10.1524/ract.2006.94.2.107.
21. Argyrou M., Valassi A., Andreou M., Lyra M. Rhenium-188 Production in Hospitals, by W-188/Re-188 Generator, for Easy Use in Radionuclide Therapy. *International Journal of Molecular Imaging*. 2013;290750. DOI: 10.1155/2013/290750.
22. Chhabra A., Rathore Y., Bhusari P., Vatsa R., Mittal B. R., Shukla J. Concentration protocol of rhenium-188 perrhenate eluted from tungsten-188/rhenium-188 generator for the preparation of high-yield rhenium-188-labelled radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine Communications*. 2018;39(10):957–959. DOI: 10.1097/MNM.0000000000000893.
23. Uccelli L., Pasquali M., Boschi A., Giganti M., Duatti A. Automated preparation of Re-188 lipiodol for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011;38(2):207–213. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2010.08.011.

## REFERENCES

1. Kodina G., Tulskaya T., Gureev E., Brodskaya G., Gapurova O., Drosdovsky B. Production and Investigation of Rhenium-188 generator. In: Nicolini M., Bandoli G., Mazzi U., editors. *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine 3*. New York: Cortina International-Verona-Raven Press; 1990. P. 635–641.
2. Knapp F. F. Jr., Mirzadeh S. The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1994;21(10):1151–1165. DOI: 10.1007/BF00181073.
3. Knapp F. F. Jr. Rhenium-188 – a generator-derived radioisotope for cancer therapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 1998;13(5):337–349. DOI: 10.1089/cbr.1998.13.337.
4. Pillai M. R., Dash A., Knapp F. F. Jr. Rhenium-188: availability from the  $(^{188}\text{W})/(^{188}\text{Re})$  generator and status of current applications. *Current Radiopharmaceuticals*. 2012;5(3):228–243. DOI: 10.2174/187447101205030228.
5. Kodina G. E., Krasikova R. N. Methods for obtaining of radiopharmaceuticals and radionuclide generators for nuclear medicine. Moscow: Izd. dom MEI; 2014. 282 p. (In Russ.)
6. Lepareur N., Lacceuille F., Bouvry C., Hindré F., Garcion E., Chérel M., Noiret N., Garin E., Knapp F. F. Jr. Rhenium-188 Labeled Radiopharmaceuticals: Current Clinical Applications in Oncology and Promising Perspectives. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:132. DOI: 10.3389/fmed.2019.00132.
7. Mushtaq A., Bukhari T. H., Khan I. U. Extraction of Medically Interesting  $^{188}\text{Re}$ -Perrhenate in Methyl Ethyl Ketone for Concentration Purposes. *Radiochimica Acta*. 2007;95(9):535–537. DOI: 10.1524/ract.2007.95.9.535.
8. Tsivadze A. Yu., Filyanin A. T., Romanovskii V. N., Zykov M. P., Kodina G. E., Malysheva A. O., Filyanin O. A., Nepomnyashchii O. N. Extraction Centrifugal Generator of  $^{188}\text{Re}$  and Radiopharmaceuticals Based on It for Radionuclide Therapy. *Radiochemistry*. 2016;58(5):443–449. (In Russ.)
9. Ponsard B., Hiltunen J., Vera-Ruiz H., Beets A. L., Mirzadeh S., Knapp F. F. Jr. The Tungsten-188/Rhenium-188 Generator: Effective Coordination of Tungsten-188 Production Between the HFIR and BR2 Reactors. *J Radioanalytic Nucl Chem*. 2003;257:169–174.
10. Karelina E. A., Efimov V. N., Filimonov V. T., Kusnetsov R. A., Revyakin Y. L., Andreev O. I., Zhemkov I. Y., Bukh V. G., Lebedev V. M., Spiridonov Y. N. Radionuclide Production using a Fast Flax Reactor. *Appl. Radiat. Isot.* 2000;53(4–5):825–827. DOI: 10.1016/S0969-8043(00)00236-0.
11. Brodskaya G. A., Gapurova O. U. Development of a High Activity Tungsten-188/Rhenium-188 Generator. *Radiochemistry*. 1993;35(3):325–329.
12. Basmonov V., Kolesnik O., Ignatova A. Rhenium-188 Chromatographic Generator and Therapeutic Radiopharmaceutical. *Eur J Nucl Med*. 1998;25:1043.
13. Knapp F. F. Continued Availability of the Tungsten-188/Rhenium-188 Generator to Enhance Therapeutic Utility of  $^{188}\text{Re}$ . *International Journal of Nuclear Medicine Research*. 2017;3–15. DOI: 10.15379/2408-9788.2017.02.
14. Lepareur N., Garin E., Noiret N., Herry J. Y. A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced  $^{188}\text{Re}$ . *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2004;47(12):857–867. DOI: 10.1002/jlcr.863.
15. Oh S. J., Moon D. H., Ha H. J., Park S. W., Hong M. K., Park S. J., Choi T. H., Lim S. M., Choi C. W., Knapp F. F. Jr., Lee H. K. Automation of the synthesis of highly concentrated  $^{188}\text{Re}$ -MAG3 for intracoronary radiation therapy. *Applied Radiation and Isotopes*. 2001;54(3):419–427. DOI: 10.1016/S0969-8043(00)00279-7.
16. Kodina G. E., Malysheva A. O., Klementieva O. E., Lyamtseva E. A., Taratonenkova N. A., Voronitskaya N. N., Seminenko N. P., Grafskova T. A. Radiopharmaceutical composition for radiosynovectomy and method for its preparation. Patent RUS № 2624237 C1. 03.07.2017. Available at: [https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips\\_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2624237&TypeFile=html](https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2624237&TypeFile=html). Accessed: 31.05.2022. (In Russ.)
17. Kampen W. U., Boddenberg-Pätzold B., Fischer M., Gabriel M., Klett R., Konijnenberg M., Kresnik E., Lelouche H., Paycha F., Terslev L., Turkmen C., van der Zant F., Antunovic L., Panagiotidis E., Gnanasegaran G., Kuwert T., van den Wyngaert T. The EANM guideline for radiosynoviorthesis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2022;49(2):681–708. DOI: 10.1007/s00259-021-05541-7.
18. Lepareur N., Ardisson V., Noiret N., Garin E.  $^{188}\text{Re}$ -SSS/Lipiodol: development of a potential treatment for HCC from bench to bedside. *International Journal of Molecular Imaging*. 2012;278306. DOI: 10.1155/2012/278306.
19. Guhlke S., Beets A. L., Oetjen K., Mirzadeh S., Biersack H. J., Knapp F. F. Jr. Simple New Method for Effective Concentration of  $^{188}\text{Re}$  Solutions from Alumina-Based  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  Generator. *J Nucl Med*. 2000;41(7):1271–1278.
20. Mansur M. S., Mushtaq A., Jehangir M. Concentration of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate and  $^{188}\text{Re}$ -perrhenate. *Radiochimica Acta*. 2006;94(2):107–111. DOI: 10.1524/ract.2006.94.2.107.
21. Argyrou M., Valassi A., Andreou M., Lyra M. Rhenium-188 Production in Hospitals, by W-188/Re-188 Generator, for Easy Use in Radionuclide Therapy. *International Journal of Molecular Imaging*. 2013;290750. DOI: 10.1155/2013/290750.
22. Chhabra A., Rathore Y., Bhusari P., Vatsa R., Mittal B. R., Shukla J. Concentration protocol of rhenium-188 perrhenate eluted from tungsten-188/rhenium-188 generator for the preparation of high-yield rhenium-188-labelled radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine Communications*. 2018;39(10):957–959. DOI: 10.1097/MNM.0000000000000893.
23. Uccelli L., Pasquali M., Boschi A., Giganti M., Duatti A. Automated preparation of Re-188 lipiodol for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011;38(2):207–213. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2010.08.011.



Research article

## Impact of Parameter on Nanostructured Lipid Carrier Formulation and Approach of the Carrier for Cancer Treatment: a Brief Study

Laxmidhar Sahoo<sup>1</sup>✉, Goutam Kumar Jena<sup>2</sup>, Chandra Sekhar Patro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centurion University of Technology and Management, Odisha, India

<sup>2</sup> Roland Institute of pharmaceutical sciences, Berhampur, Odisha, India

✉ Corresponding author: Laxmidhar Sahoo. E-mail: lsahoo81@gmail.com

ORCID: Laxmidhar Sahoo – <http://orcid.org/0000-0002-1822-7241>; Goutam Kumar Jena – <http://orcid.org/0000-0002-0374-5433>; Chandra Sekhar Patro – <http://orcid.org/0000-0003-2886-8664>.

Received: 30.05.2022

Revised: 22.09.2022

Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** For the last decade, nanotechnology has been studied extensively in the pharmaceutical field. Among all the nanotechnology formulation areas, nanostructured lipid carrier is enormously researched by formulation scientists as it is one of the focused areas of lipid carrier for the effective formulation.

**Materials and methods.** The nanostructured lipid carrier (NLC) consists of solid lipid, liquid lipid & surfactant for fabrication of formulation. Methods such as high energy methods, low energy methods and organic solvent-based methods are used for the preparation of NLC. As per literature study the High pressure homogenization is the most efficient method for fabrication of formulation.

**Results and discussion.** This carrier system has significant advantages such as high drug entrapment, improved bioavailability, stability during storage, and targeting the site with a better-controlled release making it a prominent area for the formulator to emphasize on it. Although many drugs are formulated with a nanostructured lipid carrier, it is a concern for researchers to find out the effectiveness of formulation by studying the process parameter and safety.

**Conclusion.** The present review was focused to study the impact of various parameters such as Lipid, surfactant, homogenization rate, preservative, Crystallinity, and surface charge on the formulation. The study also extended towards toxicity and biocompatibility, topical targeting & cancer treatment of the Nanostructured lipid carrier.

**Keywords:** nanostructured lipid carrier, toxicity & biocompatibility, surface charge, stability, topical targeting, cancer, brain tumor target

**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 participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**For citation:** Sahoo L., Jena G. K., Patro C. S. Impact of parameter on nanostructured lipid carrier formulation and approach of the carrier for cancer treatment: a brief study. *Drug development & registration*. 2022;11(4):95–107. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-95-107>

## ABBREVIATION

NLC	Nanostructured lipid carrier
SL	Solid lipid
LL	Liquid lipid
BBB	Blood-Brain barrier
EE	Entrapment efficiency
PDI	Polydispersity Index
OA	Oleic acid
GMS	Glyceryl Monostearate
BHT	Butylated Hydroxytoluene
BHA	Butylated Hydroxyanisole

using surfactants of particle size in the range of 10–1000 nm. [1, 2–92]. The use of liquid lipids in the matrix of solid lipids can make high imperfections to the crystal lattice and ultimately improve the capacity of drug loading and decrease drug expulsion while storing it [3]. The primary principle involved in the selection of lipid for the manufacture of Nanostructured lipid carriers is drug solubility study in different types of lipids, drug partitioning behavior in solid as well as liquid lipid & study of the compatibility of different lipid mixtures [4]. The rationale behind the NLC is oil (liquid lipid) should be integrated into the core of solid lipid which improves drug loading & imparts controlled release behavior as the drug dissolves in the oil and leads to encapsulating the drug in the solid core [87]. The poor bioavailability and low solubility of many drugs are challenging for formulators. Even though several carriers gradually developed nanostructured lipid carrier is one step ahead

## INTRODUCTION

Nanostructured Lipid Carriers (NLC) is a drug delivery system consisting of a mixture of solid along with liquid lipids, to form a lipid core matrix that is stabilized by

among all carriers because of their numerous advantages in drug delivery. The lipid used in NLC formulation is biocompatible nature biodegradable with minimal toxicity [88]. The NLC system is composed of solid lipid & liquid lipid that make the carrier quite imperfect & hold more amounts of the drug. The characteristics such as low toxicity, controlled release, biocompatible, drug safety, high drug loading, and removal of organic solvent during production make the NLC as most acceptable lipid carrier and continuously gaining significance in drug delivery [89]

### Structure of NLC

The structure of NLC is categorized into 3 groups which are based on the drug molecule position to be found (figure 1, table 1) [5, 36, 37].

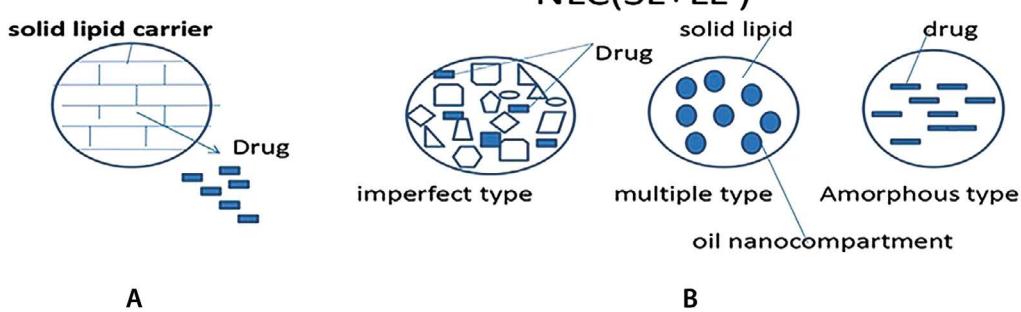
- NLC type I (imperfect crystal type).
- NLC type II (multiple types).
- NLC type III (amorphous type).

### Component of NLC

The different types of solid lipid, liquid lipid, and surfactant are used in formulation by studying their physical, and chemical properties and HLB value (table 2) [6, 7, 38, 42–45].

**Table 1. Type of NLC with characteristics [84]**

NLC type	Name	Characteristics
I	Imperfect	The imperfect crystal structure terms as type I NLC. The solid matrix is arranged very bad way. The imperfection produced in NLC is due to the presence of various lipids in the formulation As the solid matrix is badly structured. The imperfection with numerous voids leads to more drug loading of a formulation.
II	Multiple	Type-II is called a multitype of NLC. The oil concentration is more in this type. The two lipid phases are separated during the process of crystallization. At a particular temperature, the miscibility problem can lead to the precipitation of small oily nanocompartment. When the drug solubility is less in lipid the more amount of liquid lipid addition is more advantageous to the solid matrix which prevents drug expulsion but liquid lipid exhibit high solubility
III	Amorphous	The type-III of NLC is amorphous. In this type, the NLC can be prepared by mixing lipids in a manner to avoid crystallization. Here the lipid matrix remains in an amorphous state. In this method chance of drug, expulsion is due to crystallization, which can be avoided by mixing solid lipids with other special type lipids such as isopropyl palmitate.



**Figure 1. Structural observation of different types of NLC [85]**

Part (A) indicates drug expulsion easily from solid lipid carrier. Part (B) indicates it composed of solid lipid and liquid lipid and drug remain inside of carrier.

Abbreviations: SL – solid lipid; LL – Liquid lipid

**Table 2. List of lipids & surfactants with their HLB value:**

Solid lipid	HLB value	Liquid lipid	HLB value	Surfactant	HLB value
Monostearin	3	Oleic acid	1	Poloxamer 188,	29
Compritol-888 ATO	5	Linoleic acid	8	Sodium deoxycholate	16–17
Softisan145	10	Migloyl 812	15.3	Tween 80	15
Precirol ATO 5	2	Labrafac CC	1	Transcutol®P,	4.2
Dynasan114	3	Soyabean oil	7	Span 40	6.7
Imwitor 900 K	3	Labrafil M 1944CS	4	Gelucire 5/13	2
Stearic acid	15	Isopropyl palmitate	1.6	Cremophor EL	13
Cetyl palmitate	10	Capryol 90	6	Myverol 18-04 K	3.8
Gelucire® 44/14	11	Capmul MCM	5–6	Brij® 78	15.31
Gelucire® 43/01	1	Isopropyl myristate	2.8	Kolliphor HS15	14–16

## MATERIALS AND METHODS

The NLC formulation is composed of solid lipid (SL), aqueous soluble surfactant, and liquid lipid (LL) as major components and used in proper ratio. The other excipients used are preservatives, antioxidants, and cryoprotectants to improve the stability of NLC. Usually the solid to liquid lipid ratio from 70:30 to 99.9:0.1 and surfactant from 0.5 to 5 % are used in the formulation [90]. The amorphous form of the solid matrix of NLC formed due to the presence of SL and LL. Fundamentally the presence of LL in NLC makes it differ from SLN (solid lipid nanocarrier). The contributory role of LL improves drug loading in NLC. Cryoprotectants are required when the lyophilization of NLC formulation is required and the agents include dextrose, sorbitol, PEG 4000, etc. [91]. To prevent oxidation of unsaturated fatty acid and chemical degradation of drug, antioxidants such as alpha-tocopherol, BHT, BHA are commonly used. The study also reveals that use of 5–10 % propylene glycol as a preservative; there is no significant change in zeta potential (ZP) and particle size compared with formulation without preservatives [92].

The various methods used to prepare NLC formulation are high-pressure homogenization, ultrasonication, microemulsion, solvent injection method, melts emulsification and solidification method, solvent emulsification/evaporation method, supercritical fluid method.

### NLC Fabrication

Two methods: a) high energy method; b) low energy methods and c) organic solvent-based method adopted to fabricate the NLC formulation. The first method conceptualized the high shear force produced from the equipment used in formulation preparation, pressure distortion, and mechanism for reducing particle size. However the second method i.e. low energy method

used to reduce particle size does not depend on any specific amount of energy. Because of the easy scale-up & less time required for production HPH (high-pressure homogenization) method is more preferred compared to others [7]. The methods are presented in figure 2, table 3.

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Concern for effective formulation of nlc:**

#### **Size of particle & polydispersit**

The size of a particle and its distribution affect the characteristics such as solubility, biological performance, stability, and drug release of NLC. Generally, the particle diameter ranges from 10–1000 nm of NLC. Many formulation factors that affect the particle size are a type of lipid and its concentration, type of surfactant & its concentration, homogenization speed & cycle, process temperature, pressure, and lyophilization [8].

*Case study 1.* Jabber Emami et al, conducted a research study and found that oleic acid (OA) a solid lipid, and poloxamer (1 % as surfactant) have a contribution to the size of the particle. The presence of a higher concentration of OA (30 %) decreases viscosity inside the NLC as well as surface tension that leads to smaller particle size. The study was conducted for the formulation of NLC containing paclitaxel as a drug [9]. From the study polydispersity Index was found to decrease with increased OA content..It indicates that OA content influences nanoparticles with uniform particle distribution due to less size of the particle. A similar study was conducted by Hu et al using clobetasol as a drug, stearic acid, and various concentrations of OA used up to 30 % and found a decrease in particle size [10]. The above case study reveals that a higher concentration of oleic acid (as solid lipid) produce smaller particle due to lower surface tension & viscosity. The researcher's study

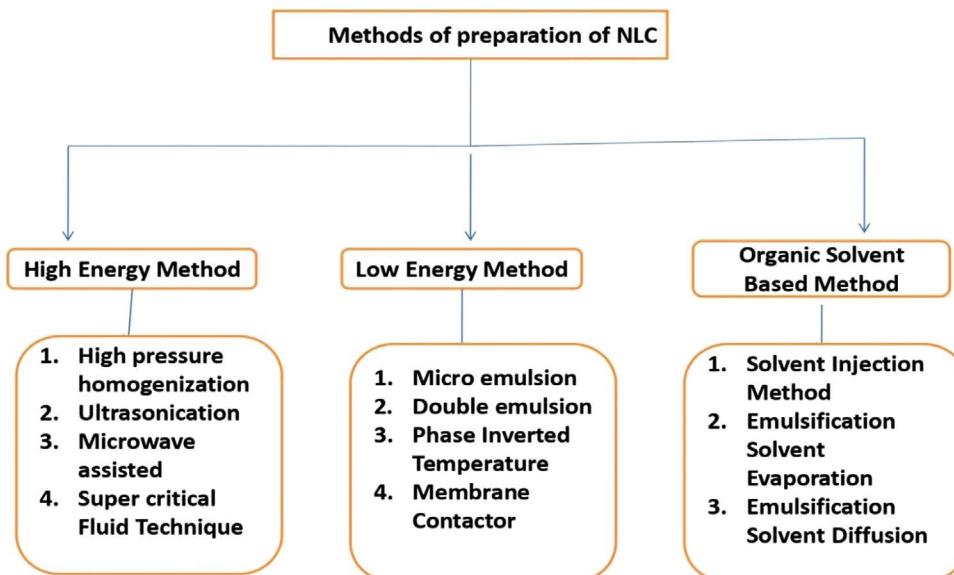


Figure 2. Different methods of fabrication of NLC

**Table 3. Various methods with process description for NLC fabrication**

Name of methods	Description of process	References
High-pressure homogenization	Selected lipid mixture heat at temperature 50 °C above the M.P of SL (solid lipid) along with drug in a beaker. The surfactant solutions at the same temperature mix with the lipid-drug mixture and homogenized with high pressure. Then cool down & go for lyophilization to get NLC. The high-pressure homogenization can be used as hot & cold HPH depending on the temperature environment used.	[76]
Ultrasonication	The lipids and drug mixture are prepared & mix with an aqueous surfactant at the same temperature using high shear pressure. The formed coarse emulsion was subjected to ultrasonication to make a nanosize emulsion & cool down to room temperature to get NLC	[77]
Supercritical fluid method	In this method melted solid lipid mix with carbon dioxide (SCF) with drug and surfactant. Then the preparation is atomized & sprayed in a specialized chamber followed by decompression & evaporation that form NLC	[78]
Microemulsion	This method involves a drug solution that has to be added to the lipid mixture along with an aqueous surfactant to produce an emulsion. It is also affected by hydrophilic & lipophilic phase ratios. The prepared emulsion is exposed to cold water with an agitation which gives a dispersion of NLC. The microemulsion method is suitable for a thermolabile drug	[78]
Double emulsion	This method involves the preparation of primary emulsion by mixing an aqueous solution of the drug with melted lipid and lipophilic surfactant. The primary emulsion is formed again mixed with an aqueous surfactant to form w/o/w emulsion. Then nanoparticles are purified by using the solvent evaporation method. The double emulsion method is suitable for formulation with low lipid content.	[79]
Membrane contractor	In this method melted lipid is mixed with drug and permeates through a ceramic membrane containing a specific size pore. Then aqueous surfactant solution passes tangentially to the membrane and removes the droplet at the outlet of the pores by using a brush. It cools at room temperature to get lipid nanoparticles, The pore size & and pressure applied at the lipid phase affect the size of the particle	[80]
Solvent Injection method	This method involves faster diffusion of aqueous solvent in a lipid matrix. The lipid matrix mixes with water-soluble solvent and is injected into the surfactant solution with continuous stirring. The aqueous solution will diffuse inside it. The precipitation of lipid nanoparticles was observed in an aqueous solvent. The major problem is solvent residue may remain in it	[81]
Solvent emulsification evaporation method	This method involves mixing lipid matrix containing drug with water-miscible organic solvent and it was dispersed in aqueous surfactant solution with continuous stirring then organic solvent evaporates from it leads to produce lipid nanoparticles	[82]
The solvent emulsification diffusion method	This method involves partly the use of water-miscible solvent to disperse lipid & drugs. The thermodynamic equilibrium is maintained with a proper ratio of water & organic solvent. Initially, O/W emulsion is formed by dispersing lipid & drug then diluted with water in a particular ratio so that solvent diffuses in a continuous phase to precipitate the nanoparticles	[83]

report that the higher concentration of solid lipid (Oleic acid) i. e. up to 30 % concentration only shows a smaller particle size.

*Case study 2.* The particular research was conducted by X.Lin et al (2007) using medium-chain Triglyceride as a liquid lipid for NLC preparation. The research was targeted to know the effect of liquid oil on the particle size of NLC. In this work total lipid was constant but changes were made in the quantity of liquid lipid. The inference was found that initially increase in particle size with an increase in the amount of liquid oil and when oil proportion was above 20 % wt the particle size decreases. The case study reveals that when liquid lipid (oil) is above a specific weight in the formulation it leads to a decrease in particle size. Hence it can be concluded that the liquid lipid amount used in the formulation influences particle size [11].

*Case study 3.* A study by S.Anantachaisilp et al reveals that with increasing liquid lipid concentration from

0 to 10 %. The average particle size of the formulation decreases (from 196 nm to 160 nm). The research data shows that with 0, 2.5, and 5 % concentration of liquid lipid there was a negligible difference in particle size & polydispersity index (PDI). However, at 7.5 and 10 %, there was a significant decrease in particle size and PDI [12]. The concluding remark of the case study was with increasing up to a certain concentration of liquid lipid the particle size decreased. Hence it can be concluded that different concentrations of liquid lipid have an impact on the size of particle & particle size distribution.

#### ***Impact of homogenization time & shear intensity***

*Case study 1.* A research study was conducted by Andree A. M. shimojo et al to know the impact of shear intensity and homogenization time on various characteristics of NLC formulation. Resveratol was used as a drug

candidate for the study. The research work used homogenization speeds 13 000, 19 000, and 24 000 as shear intensity (rpm) and time 2, 6, 10 as shear time (minutes). The report shows that a shear intensity of 24 000 rpm and shear time of 10 minutes resulting decreased particle size (142 nm) and PDI (0.353). The study also reveals the zeta potential of formulation (-11.67mV) and entrapment efficiency of 94.2 %. So it can be an inference that homogenization time and shear intensity have an impact on the characteristics of NLC formulation [13].

**Case study 2.** Effect of high shear homogenization (HSH) & Ultrasonication: A research study was conducted by V. trivedi et al (2021) to know the impact of HSH & ultrasonication by using Olanzapine as a drug candidate. It reveals that not only does HSH reduce the particle size but also there was an impact of ultrasonication on the reduction of particle size. The report shows that the range of particle size by HSH (148–191 nm) was reduced to a range of 118–164 nm with the use of ultrasonication for one minute. The study reveals that the contribution of sonication energy to nanostructured lipid carrier formulation leads to decrease particle size. Hence it can be the inference that the particle size of NLC formulation is affected by high shear homogenization & ultrasonication [14].

### **Effect of surfactant**

it was reported from many research works that surfactant reduces the size of the particle, maintains PDI, and enhances the stability of NLC formulation. Surfactant with a concentration of 1–5 % has an impact to reduce the particle size. The study also reveals that particle size reduction is directly proportional to the surfactant to total lipid ratio in the formulation [46].

**Case study 1.** An experimental work was carried out by Akramm Pezeshki et al for betacarotene NLC to know the effect of surfactant concentration on particle size, Zeta potential, and stability of the formulation. The study was conducted by using poloxamer 407 in different concentrations (2, 3, 4, 6 %). The report shows that the average particle size of the formulation was 88, 79, 94 and 115 nm concerning the above surfactant concentration respectively. From the experimental work, it was concluded that 3 % poloxamer concentration can effectively reduce particle size as compared with other concentrations. Hence surfactants have an impact on the particle size of NLC formulation. The zeta potential with optimized surfactant was 0.276 mV and after 60 days of storage and the mean particle size was 87 nm [15].

**Case study 2.** A research work was carried out by Ahmed R. Gardouh et al (2018) using Dermarol DCO®, Dermarol CCT® as liquid lipid, and Naterol GMS® as solid lipid along with using Tween 80 and span 20 as surfactants. The study aimed to determine the effect of surfactants on particle size. The surfactant concentration ratio of Tween 80 and span 20 was 2.5/1,5/1,10/1,15/1 w/w percentage. From the study, it was observed that the surfactant ratio of 5/1,2.5/1 was good to prepare NLC.

With a surfactant ratio, of 2.5/1 the particle size ranges from 150 to 220 nm, and with a surfactant ratio of 5/1 particle size ranges from 157 to 324. Hence the study proved that the ratio of surfactant concentration has an impact on particle size [16].

**Case study 3.** F. Han et al (2008) reveal their research work that the effect of nonionic surfactants has more contribution as compared with other surfactants for the stability of NLC formulation. The work was conducted by using four types of surfactant (poloxamer 188, soya lecithin, sodium deoxycholate, tween 80). The study aimed to know the effect of surfactants on the characterization of NLC. The results indicate that the ionic surfactant (sodium deoxycholate) has a low emulsification ability but improves the ZP (zeta potential) of the formulation. But the surfactant such as non-ionic surfactant (poloxamer 188) shows additional stearic stability of formulation [47].

**Case study 4.** A study was conducted by Kovacevic et al. by using two surfactants ( Plurol Stearique® WL 1009 and Plantacare® 810), cetyl palmitate (SL), Miglyol 812 (LL) to prepare NLC 30 % w/w lipid stable up to 90 days. However, after increasing lipid concentration to 40 % w/w formulations. At a concentration of 1 %, both surfactants reduced the particle size to <200 nm, and the formulation containing particle size increased but was stabilized by Plurol Stearique® WL 1009. The surfactant Plantacare® 810 shows its stabilization effects even the lipid concentration at 50 % w/w but above it, the NLC shows a destabilization effect [49]. The study reveals that different types & concentrations of surfactants have an impact on the formulation.

### **The Crystallinity of NLC formulation**

It is important to understand the lipid phase behaviors when it was part of the formulation. Generally, a lipid with a temperature well above melting point can maintain some degree of ordering in the liquid phase termed the crystalline memory effect. However, high-temperature heating and subsequent cooling lead to destroying the memory and formation of different phases [17].

The composition & drop size of melted lipid is responsible for the crystalline behavior of particle of solid lipid. The process of nucleation depends on the process used, rate of cooling, and solidification of starting material (lipid) first from the mixture [18]. As the NLC contains both solid lipid & liquid lipid (oil) a specific amount of solid lipid may dissolve in liquid lipid with increased temperature. Usually, with high-pressure homogenization and process temperature more amount of solid lipid dissolve in oil. When the temperature of the mixture decreases leads to the initiation of a crystallization process that forms different crystalline forms (stable & metastable) which depends on lipid compatibility in a mixture [19]. Low energy polymorphs are formed due to the rapid cooling of liquid lipid. Upon slower cooling, the lipid molecules get sufficient time to organize into lamellae and formed

three-dimensional crystals. Many factors are responsible for the arrangement of molecules in a crystalline state such as temperature & cooling rate, the composition of lipid, and rate of agitation.

The most arguable parameter influencing lipid crystallization is subcooling (cooling of lipid below equilibrium point). As subcooling increases the rate of nucleation increases and decreases induction time for crystallization. The promotion of nucleation may be by agitation which produces mechanical disturbance (energy supplied to overcome the energy barrier) [20]. A higher agitation rate is responsible for small crystal formation and high crystallization rate however slow cooling rate and slow agitation produced mixed crystal that leads to an increased melting range. During the slow cooling stage, the lipid has more opportunity to form crystal lattice as the temperature remains more time in higher.

The very common method employed to investigate the polymorphic form and Crystallinity is DSC & X-ray diffraction. DSC can investigate the structure of NLC by mixing the behavior of SL (solid lipid) and LL (Liquid lipid). The process of fusion & breakdown of crystal lattice by cooling and heating give information about crystal ordering and polymorphism. XRD is also another technique to find out polymorphic changes. WAXS (wide-angle x-ray scattering and SAXS (small-angle x-ray scattering) were used to know the layer arrangement of crystal structure, and polymorphic form [21]. The storage time, amount of drug-loaded, and viscosity of formulation may significantly affect the Crystallinity of lipid-based nanoparticles. Using solid lipid (SL) with crystal lattice imperfection can enhance encapsulation efficiency and chemical stability more housing of drug in lipid matrix [22, 23]

### **Stability of NLC formulation**

Perkinetic flocculation may occur due to aggregation of a particle on long-term storage. During the storage period, all NLC preparation should maintain the proper-

ties of nanoparticles and also prevent the growth of microorganisms. The two methods are adopted: 1) freeze-drying of NLC preparation to remove water, and 2) use of preservatives. The freeze-dried product must maintain the therapeutics activity of the encapsulated drug. It should resuspend with water in less reconstitution time. However many studies revealed that there is an aggregation of a particle without the use of cryoprotectant during the freeze-drying process. The common cryoprotectants used in NLC formulation are microcelac, trehalose, dextrose, mannitol, sucrose, and Avicel RC597 [24].

Mostly for dermal products the preservative use to maintain stability (because preparations are fluid or semisolid). However, preservatives not only stabilize formulation but also it can destabilize. Hence its effect needs to be understood. The parameters are

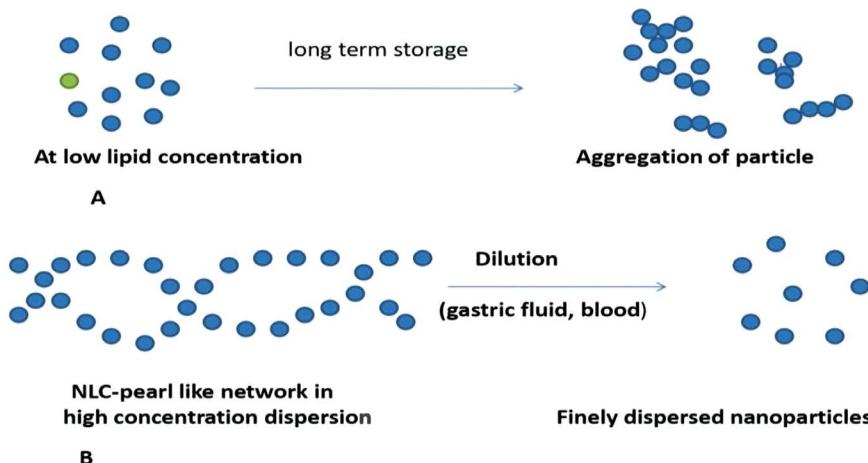
- preservative ability to reduce zeta potential;
- hydrophobicity character of the particle surface;
- the affinity of preservative to the surface of the particle;
- stabilizer anchoring to particle surface (onto/into);
- interaction between preservative & stabilizer layer.

The study also revealed that the thermodynamic stability of lipid polymorphic form is affected by the melting point of the stabilizing agent. If the stabilizer has melting point greater than 50 °C it will maintain the lipid in low thermodynamic stability whereas the melting point less than 00C causes stable polymorphic transition [25]. The list of preservatives with their composition & effective concentration used in NLC formulation is presented in table 4 and figure 3 [26].

**Approaches for NLC stability.** Approaches such as lyophilization, the addition of non-ionic surfactant, spray drying, and the addition of hydrophilic substances (PEG 4000) make the formulation more stable. These are presented in table 5.

**Table 4. List of the preservatives [26]**

Name	Effective range	Composition
Rokonsal®PB5	0.3–1.2	Phenoxyethanol 71–73 %, methylparaben 14–15 %, ethylparaben 5.5–6.1 %, propylparaben 2.2–2.6 %, butylparaben 3.4–3.8 %, isobutylparaben 1.6–2 %
Euxyl® PE9010	1.0	Phenoxyethanol 90 %, ethylhexylglycerin (1,2-propanediol, 3-(2-ethylhexyloxy) 10 %
Dermosoft® Octiol	0.5–1.0	Caprylyl glycol (octane-1,2-diol)
Phenonip®	0.5–1.0	Phenoxyethanol 70–75 %, methylparaben 14.5–16.5 %, ethylparaben 3.3–4.3 %, propylparaben 1.7–2.3 %, butylparaben 3.4–4.3 %, isobutylparaben 1.7–2.3 %
Hydrolite® 5	1.5–5.0	Pentylene Glycol (1,3-pentanediol)
Euxyl® K702	0.2–1.0	Phenoxyethanol 77 %, benzoic acid 13 %, dehydroacetic acid 6 %, polyaminopropylbiguanide 2 %, ethylhexylglycerol 1%, water 2 %
Ethanol 96%	>20 % v/v	Ethanol 96 % v/v
Propylene glycol	10.0	Propylene glycol, 1,2-propanediol
Euxyl® K700	0.5–1.5	Phenoxyethanol 30 %, benzyl alcohol 30 %, potassium sorbate 15 %, tocopherol 15 %, water 10 %



**Figure 3. Stabilization effect.**

**A – at low lipid concentration of formulation produces an aggregation of the particle on long-term storage; B – NLC pearl-like network converts to the finely dispersed particle on dilution with gastric fluid, and blood [24]**

**Table 5. Methods used for NLC stability**

Approaches	Description	References
Lyophilization	It is the most efficient method for avoiding Ostwald ripening and avoid degradation of water-sensitive drugs but it is advisable to add cryoprotectant in the formulation during lyophilization	[71]
Spray drying	This method involves the spraying of preparation to get powder form which can be stored for a longer period for further use. Here to avoid lipid degradation, the melting point of lipid must be greater than the boiling point of sprayed liquid to be considered before spray. To decrease the M. P of the mixture, a water-alcohol system was used instead of using pure water in preparation	[72]
Addition of non-ionic surfactant (poloxamer)	Polaxomer of various grades are used as a stabilizing agent in nanoparticle formulation. The mechanical stability of nanoformulation is enhanced with the use of poloxamer 188 while 407 grade of poloxamer forms micelle with alcohol present in the formulation and makes it thermodynamic stable	[73, 74]
Addition of hydrophilic substance (PEG 4000)	The addition of substances like polyethylene glycol 4000 produces benefits like dispersibility, physical stability, lipid modification, and growth of NLC so that stability of NLC can be maintained	[74]

### Entrapment efficiency (EE)

The characteristics of drug release affected by the drug entrapment efficiency. It can be defined as the ratio of the difference between the total amount of drug used in the formulation and unentrapped drug to the total amount of drug. The amount of solid lipid & liquid lipid in formulation affect the entrapment efficiency of the drug. Generally, the presence of a higher concentration of liquid lipid changes the nature of the crystal lattice and enhances the imperfection resulting in higher entrapment of the drug. The lipophilic nature of the drug also enhances the encapsulation efficiency due to the drug having more affinity to lipid [27]. The primary concern for improving EE depends on the solubility of the drug in lipid & the solubility of the drug in lipid must be more as compared with required because when melted lipid cools down it solidifies and there are chances of a decrease of solubility [48].

**Case study 1:** Jaber Emami et al conducted research work for NLC formulation with ART (Artemisinin) as a drug along with Compritol (solid lipid), and oleic acid (liquid lipid) & poloxamer (surfactant). By increasing the concentration of liquid lipid i.e oleic acid, the entrapment efficiency of formulation increased from 59 to 83 % indicating the effect of liquid lipid on EE [28]. Due to imperfection of NLC structure more space is created in the formulation as a result entrapment of drug is more [29].

### Effect of Surface charge

Particle aggregation or dispersion and stability of formulation affected by the surface charge of NLC. The various factors that affect the surface charge are ionic strength, ion types covering the aqueous phase & pH. Greater the electrostatic repulsion more the surface charge leads to less aggregation of particles. The zeta potential is the parameter used to measure the surface

charge. The stable NLC should have Zeta potential value  $\pm 30$  mV. The amount of solid lipid and liquid lipid, type & concentration of surfactant as the formulation parameter affect the zeta potential value. The higher the liquid lipid concentrations in NLC formulation greater the net negative charges due to liquid lipid being mostly negative charge. If the formulation targeted the cancer cell, the NLC formulation must more cationic nature for electrostatic binding as cancer cells possess a high negative surface charge compared to a normal cell [30, 31]. Many factors contribute to their effect on zeta potential value is the size of the particle, nature of the particle & storage conditions. When the particle size changes it might affect the dispersion force and charge between the particles. Hence agglomeration tendency of particles affected resulting changes in the ZP (zeta potential) value [41].

## SAFETY AND BIOPATIBILITY

The component used to prepare NLC are approved and used as pharmaceutical grade especially intended for topical use. A research study was conducted by D. Douroumis et al reveals that up to a dose of 1 mg/ml of lipid can be tolerated by cell line when drug-free NLC used. A report revealed by Almeida et al that by using cetyl trimethyl ammonium bromide (cationic surfactant) the lipid-based preparation showed less toxicity at a dose over 1 mg/ml. The study by R. H. Muller et al shows that using surfactants like poloxamer 188 and polysorbate 80 ensure biocompatibility & less toxicity of lipid formulation but it should be considered that even using a mixture of surfactant to enhance the stability of formulation may produce toxicity [32, 33].

*Case study 1.* M. L. Bondi et al conducted research work on the effect of NLC formulation composition on cytotoxicity. The formulation contains Compritol 888 ATO

as solid lipid, Miglyol 812 as liquid lipid, and Epicuron 200 as surfactant along with simvastatin as API. The HuH6 & HuH7 were used as cell lines for the study. The cell exposure time was 72 h & the result suggests that no cytotoxicity during that period [34].

*Case study 2.* Group of the researcher (C. Vitorino et al) carried out a study to find out the effect of Nanostructured lipid carrier formulation on cell viability. The study includes Glyceryl tripalmitate as solid lipid, Miglyol 812 as liquid lipid, and Tween 80 as surfactant. The HaCaT was used as a cell line for study. The study was conducted for 72 h and the outcome of the study was 80 % cell viability [35].

## SKIN TARGETING

In NLC the particles are nanosize hence it has close contact with SC which leads to disturbing corneocyte arrangement resulting in more drug penetration into the deeper layer of skin. After applying NLC to the skin surface, the occlusion effect is produced due to the formation of a single layer of lipid film. The formations of the lipid layer prevent the loss of water from the skin surface and produced skin hydration. This skin hydration helps drug permeation into the deeper layer of skin [39, 40]. The process is depicted in figure 4.

## NLC APPROACH FOR CANCER THERAPY

Nanostructured lipid carrier which is an alternative to other colloidal carriers has enormous advantages such as high drug loading, stability of the formulation, controlled release & biocompatibility. Hence this carrier can be used for anticancer drug loading for better therapeutic effectiveness & targeting. The various types of the anti-cancer drug, formulation component, cell line use & outcome of research work were presented in table 4 below.

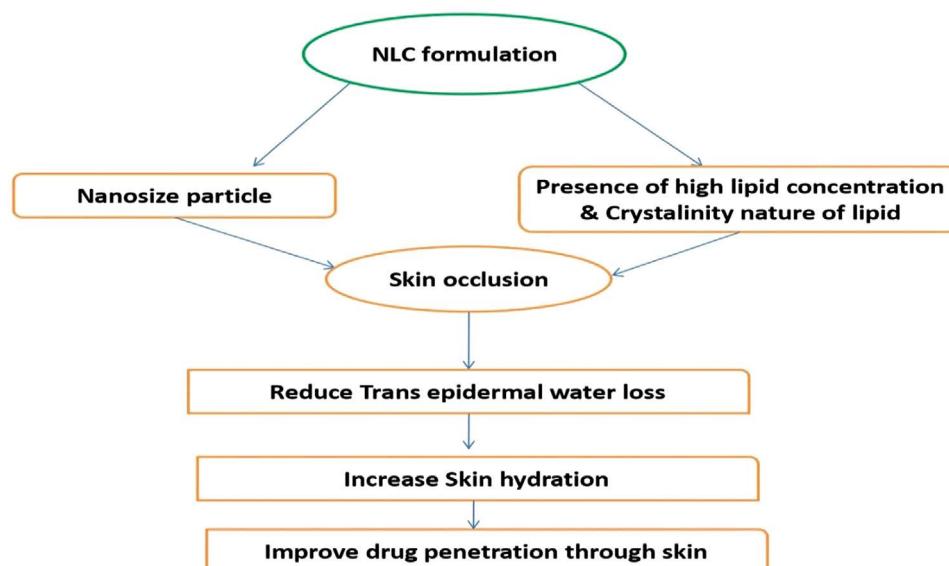


Figure 4. Drug penetration through the skin by NLC formulation

It has been reported that many limitations of an anti-cancer drug such as high toxicity to a normal cell, less specificity, stability problem, and variable pharmacokinetic profile make the drug limited use but NLC considers an effective carrier to address the problem. NLC offers more stability, high drug loading, and sustained release for better therapeutic effect. Due to advanced research hydrophilic drug (Decitabine) is now also formulated to NLC to improve drug action [65].

### **Drug action by passive target**

Passive target of the anti-cancer drug improved by changing the size of particle, shape, and surface character of NLC. Normally the pore size of a tumor's vessel range from 100 to 780 nm. Hence particle size plays a dominant role to enter into it [66].

*Case study 1.* The group of researchers Wang et al prepared NLC with paclitaxel and doxorubicin for lung cancer and find out an excellent result in terms of cytotoxicity on the H460 cell line. The particle size was  $129.3 \pm 4.2$  nm and the formulation was effective as compared with pure drug [64].

*Case study 2.* Group of researchers Z. P. Wand et al prepared an NLC formulation using berberine as an anti-cancer drug and evaluate its effectiveness on H22 tumor cells. The particle size of NLC was 138 nm which produces a better therapeutic response as compared with normal drug delivery [67].

### **Active tumor targeting**

This method involves the design of an active targeting ligand that improves more accumulation of drugs at the tumor site.

*Case study 1.* Group of researchers khajavinia et al conducted work by conjugating transferee with stearyl amine NLC with drug etoposide by using a K562 cell line

and results show there was a 15-fold reduction in case of  $IC_{50}$  compared with free drug [68].

*Case study 2.* Varshosaz J et al conducted research work by conjugating retinoic acid with octadecylamine of NLC using 5-Fluorouracil as a drug. They found that prepared NLC shows higher efficacy in case of colorectal carcinoma (figure 5, table 6) [69].

## **APPROACHES OF NLC FOR BRAIN TARGET**

In general the BBB limit many drugs to delivery into brain tissue. So strategy must be considered that formulation should be penetrating the barrier. The remarkable qualities of NLC can target the brain which is discussed below [75].

- A. **Nanosize particle.** As NLC possesses nanosize particles it can easily pass through the microvasculature of the brain.
- B. **Lipid solubility.** In the present clinical research almost all drugs used are lipophilic. NLC is composed of solid and liquid lipid in which the drug is soluble. Due to the lipid solubility nature of the drug it can reach brain tissue by a lipid-mediated diffusion process.
- C. **Protection & bioavailability of drug.** Nanostructured lipid carrier enhances bioavailability by improving drug encapsulation efficiency and protecting the drug from possible degradation. It prevents aggregation of particles and improves drug shelf life.
- D. **The polymeric coating enhances stability & penetration.** The presence of RES (Reticuloendothelial system) is responsible for the rapid elimination of NLC from the body. This can be prevented by surface modification of particles with a hydrophilic polymer such as Poloxamer, PEG, etc. This surface modification enhances drug penetration through BBB.

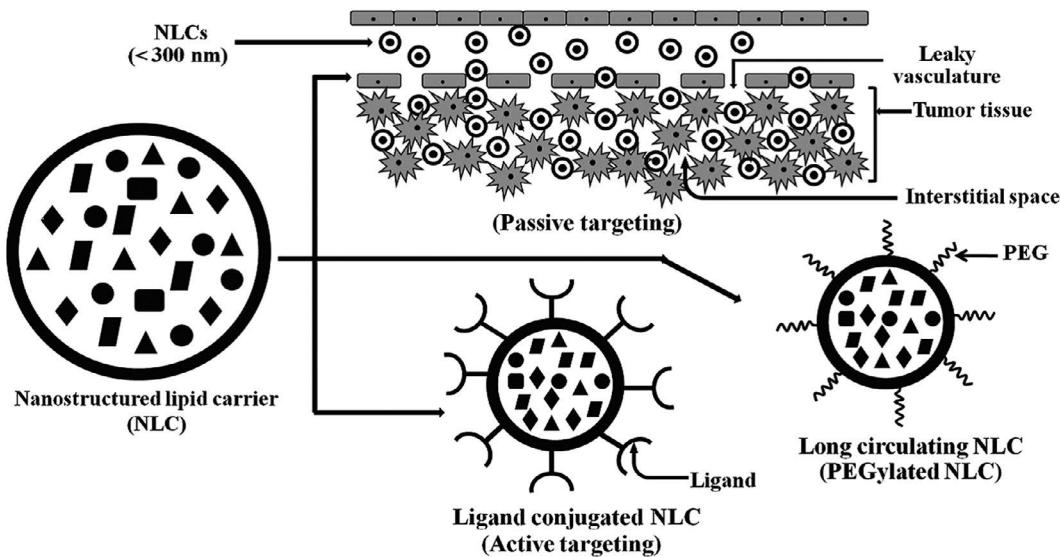


Figure 5. Targeting of NLC for tumor [86] (figure used with permission from author)

**Table 6. List of Anti-cancer drugs used for NLC formulation**

<b>Drug name</b>	<b>Cell line/Animal used</b>	<b>Component of formulation</b>	<b>Type of cancer</b>	<b>Outcomes</b>	<b>References</b>
Imatinib	MCF-7	Stearic acid, Sesame oil SLS, Tween 80	Breast cancer	MTT cytotoxicity assay conducted using NLC loaded drug with blank. It was found that the NLC formulation shows more cytotoxicity toward cancerous cell	[50]
Miltefosine (HePC)	Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) and squamous cell carcinoma-7 (SCC-7) /BALB/c mice	Stearic acid, Oleic acid, Tween 80	Breast cancer	HePC-NLC shows enhanced pharmacokinetic character and reduced hemolytic potential compared with free drugs.	[51]
Docetaxel (DTX)	male Sprague-Dawley rats	Labrafil M 1944CS, Precirol ATO 5, DSPE-PEG <sub>3K'</sub> (DSPE-PEG <sub>2K'</sub> , RIPL peptide	ovarian cancer	DTX-PEG-RIPL-NLCs suppressed tumors, evidenced by tumor volume change and histopathological examination.	[52]
Resveratrol (RSV)	MCF-7	Stearic acid, Oleic acid, DPPH, poloxamer 188	Breast cancer	In-vivo pharmacokinetic studies show a 9-fold increase in AUC values with RSV-FA-NLCs in comparison to free Resveratrol.	[53]
Etoposide (ETP)	SGC7901 cells	Glycerol monostearate, soybean phosphatidylcholine (SPC), oleic acid	Gastric cancer	The ETP-loaded NLC shows significant enhancement of in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor effect against SGC7901 cells	[54]
Doxorubicin (DOX) and β-elemene (ELE)	A549 lung cancer cells, MRC-5 cells	Compritol® 888 ATO, Miglyol® 812, Lecithin	Lung cancer	Cytotoxicity and synergistic effect observed in DOX/ELE Hyd NLC	[55]
Curcumin (CRN)	LNCaP cell lines	Oleic acid, stearic acid, Tween 80	Prostate cancer	The CRN-NLC loaded formulation shows EE 92.9 % & shows substantial tumor volume suppression (40 %)	[56]
Paclitaxel (PTX)	H1299 (NCI-H1299) cells, S180 cells, and RAW264.7 cells	Compritol 888 ATO, GMS, Kolliphor ELP & HS15	Breast cancer	RBC-loaded PTX-NLC enhanced the antitumor effect and extended the survival period significantly <i>in vivo</i>	[57]
Citral	MDA MB-231 cells	Palm oil, lipoid S-100, olive oil, Tween 80	Breast cancer	By using MTT assay, NLC-Citral inhibited the proliferation of MDA MB-231 better compare with only citral	[58]
Triptépine	CACO-2 cell line/Male Sprague-Dawley rat	Precirol ATO-5, Polaxomer 188 and Labrafil M 1944 CS	Prostate cancer	NLC-loaded triptépine shows cell viability 4.7 times compare with the only triptépine solution and exhibit more permeability in a different area of the large intestine	[59]
Decitabine (DCB)	A549 Cell line/Male albino rat	Precirol ATO 5, Tween 80, poloxamer 188, Transcutol HP, Poloxamer 188	Lung cancer	Affinity & cytotoxicity towards cancer cells improved and permeation improved 4-fold by NLC load with DCB	[60]
Isoliquiritigenin(ISL)	S180 and H22 cell lines/Female Kunming mice	GMS,poloxamer 188, Migloyl 812	Liver cancer	Compare with ISL suspension the NLC-ISL shows more inhibition on cell line (H22 & S180) and NLC formulation exhibit 2.5 times more drug concentration in the mice model	[61]
5-Fluorouracil (5-FU), Cisplatin (CDDP)	BGC823 human gastric cell line	GMS, Tween 80, soya lecithin, soya bean oil	Gastric cancer	The pro drug coated with stearic acid & Hyaluronic acid and cisplatin-loaded NLC shows an additive effect as compared with uncoated & free drug	[62]
Celecoxib (Cxb), Docetaxel (Doc)	A549 Cells/Nu mice	Compritol® ATO 888, sodium taurocholate, Miglyol 812	Lung cancer	The aerosol form of Cxb with NLC shows a greater reduction in tumor volume	[63]
Paclitaxel(PTX) & Doxorubicin (DOX)	NCL-H460 cells	Compritol® ATO 888, soybean phosphatidylcholine, oleic acid	Lung cancer	The cytotoxic effect by NLC loaded PTX and DOX enhanced 3 fold compared with NLC single drug & 9 times more in comparison with free drug	[64]

End of table 6

Drug name	Cell line/Animal used	Component of formulation	Type of cancer	Outcomes	References
Artemisinin	U-87MG brain cancer cell line	Oleic acid, Compritol®, Tween 80	Brain tumor	The objective was transferrin-conjugated NLC to target brain tumors. The EE and particle sizes were 82.3 % & $145 \pm 12.5$ nm respectively. Transferring conjugated artemisinin NLC shows higher toxicity compare to free drugs towards cancer cells	[28]
Temozolomide	Porcine nasal mucosa, wistar rat	Gelucire, Vitamin E	Brain tumour	Prolong drug release & permeation enhanced by passing through the blood-brain barrier	[70]

- E. **Active & passive targeting.** for active targeting ligand should be used to bind with receptors expressed by the cancer cell. The active target enhances the high drug retention and reduced side effect. The passive target involves 'enhanced permeability'. The abnormal cell (tumor) has high vascular permeability as compared with the normal cell. Due to this reason, nanocarriers easily penetrate. The effect was studied by Ming-Jan-Tsai et al using baicalin as a drug and found out 2–3 fold increase in drug amount in the targeted region.
- F. **Release of the drug in a controlled manner.** As the active efflux system in BBB limit the therapeutic efficacy of the drug, NLC manages it by releasing the drug in a controlled manner which enhances the availability of the drug for a long period in the brain tissue. Hence the effectiveness of the drug increases.

## CONCLUSION

NLC, a smart generation of lipid carrier gaining more popularity day to day in research because of its numerous advantages over other carrier systems. The easy methods of fabrication, lipid biocompatibility, prolong drug action, high drug entrapment, and stability extends its scope to many pharmaceuticals & cosmetics. Due to its excellent skin targeting, it is one of the prominent research areas for an alternative route of administration. With the help of a nanostructured lipid carrier, the maximum amount of drug can be targeted for brain and cancer treatment. The above case study result shows the various parameters have an impact on formulation & it will provide a research idea to the reader for optimizing formulation. Therefore NLC can consider a "smart Nanolipid carrier" for effective treatment.

## REFERENCES

- Khurana S., Jain N. K., Bedi P. M. Development of nanostructured lipid carriers for controlled delivery of mefenamic acid. *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2012;2:232–50.
- Mangesh B. R., Prashant U., Ashwini M. Solid Lipid Nanoparticles Incorporated Transdermal Patch for Improving the Permeation of Piroxicam. *Asian Journal of Pharmaceutics.* 2016;10(1).
- Muller R. H., Mader K., Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;50:161–177.
- Dilip P., Dasgupta S., Dey S. et al. Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gel for the Topical Delivery of Aceclofenac: Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation. *Sci Pharm.* 2012;80:749–764
- Sharma A., Baldi A. Nanostructured Lipid Carriers: A Review. *J. Develop Drugs.* 2018;7:191.
- Patil D., Patrewar S., Palival S. et al. Nanostructured lipid carriers: a novel targeted drug delivery system. *IJPSP.* 2020;11(10):4784–4793.
- Aldemar, Gordillo-Galeano, Elizabeth C., Mora-Huertas. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2018;133:285–308.
- Noor N. M., Sheikh K., Somavarapu S., Taylor K. M. G. Preparation and characterization of dutasteride-loaded nanostructured lipid carriers coated with stearic acid-chitosan oligomer for topical delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017;117:372–384. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.04.012.
- Emami J., Rezazadeh M., Varshosaz J. et al. Formulation of LDL Targeted Nanostructured Lipid Carriers Loaded with Paclitaxel: A Detailed Study of Preparation, Freeze Drying Condition, and In Vitro Cytotoxicity. *Journal of Nanomaterials.* 2012;1–10. DOI: 10.1155/2012/358782.
- Hu F. Q., Jiang S. P., Du Y. Z. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B.* 2005;45(3–4):167–173.
- Lin X., Li X., Zheng L. et al. Preparation and characterization of monocaprate nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2007;311:106–111. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.06.003.
- Anantachaisilp S., Smith S. M., Treetong A. et al. Chemical and structural investigation of lipid nanoparticles: drug–lipid interaction and molecular distribution. *Nanotechnology.* 2010;21(12):125102. DOI: 10.1088/0957-4484/21/12/125102.
- Shimojo A. A. M., Fernandes A. R. V., Ferreira N. R. E., Sanchez-Lopez E., Santana M. H. A., Souto E. B. Evaluation of the Influence of Process Parameters on the Properties of Resveratrol-Loaded NLC Using 2<sup>2</sup> Full Factorial Design. *Antioxidants.* 2019;8(8):272. DOI: 10.3390/antiox8080272.
- Ajiboye A. L., Nandi U., Galli M., Trivedi V. Olanzapine Loaded Nanostructured Lipid Carriers via High Shear Homogenization and Ultrasonication. *Scientia Pharmaceutica.* 2021;89(2):25. DOI: 10.3390/scipharm89020025.

15. Zirak M. B., Pezeshki A. Effect of Surfactant Concentration on the Particle Size, Stability and Potential Zeta of Beta carotene Nano Lipid Carrier. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2015;4(9):924–932.
16. Gardouh A. R., Faheem S. H., Nouh A. T., Ghorab M. M. Influence of formulation factors on the size of nanostructured lipid Carriers and nanoemulsions prepared by high shear homogenization. *Int. J. Pharm Sci.* 2018;10(4):61–75. DOI: 10.22159/ijpps.2018v10i4.23142.
17. Hernqvist L. Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids. New York: Marcel Dekker; 1998. 97–137 p.
18. Sonoda T., Takata Y., Ueno S., Sato K. Effects of emulsifiers on crystallization behavior of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. *Cryst. Growth Des.* 2006;(6):306–312. DOI: 10.1021/cg050045h.
19. Metin S., Hartel R. W. Crystallization of fats and oils. In: F. Shahidi, editor. Bailey's Ind. Oil Fat Prod. 6 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken; 2005: 45–76 p. DOI: 10.1002/047167849X.bio021.
20. Mullin J. W. Crystallization. 4 ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann Ltd.; 2001. 172–260 p.
21. Chauhan I., Yasi M., Verma M., Singh A. P. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. *Adv Pharm Bull.* 2020;10(2):150–165.
22. Zhou L., Chen Y., Zhang Z., He J., Du M., Wu Q. Preparation of tripteryne nanostructured lipid carriers and their absorption in rat intestine. *Pharmazie.* 2012;67(4):304–310.
23. Teeranachaideekul V., Müller R. H., Junyaprasert V. B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)-Effects of formulation parameters on physicochemical stability. *Int. J. Pharm.* 2007;340:198–206.
24. Khosa A., Reddi S., Saha R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018;103:598–613. DOI: 10.1016/j.bioph.2018.04.055.
25. Helgason T., Awad T. S., Kristbergsson K. et al. Impact of surfactant properties on oxidative stability of β-carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:8033–8040.
26. Obeidat W. M., Schwabe K., Müller R. H., Keck C. M. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2010;76:56–67. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.05.001.
27. Uprit S., Sahu R. K., Roy A., Pare A. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2013;21(4):379-85. DOI: 10.1016/j.jps.2012.11.005.
28. Emami J., Yousefian H., Sadeghi H. Targeted nanostructured lipid carrier for brain delivery of artemisinin: Design, preparation, characterization, optimization and cell toxicity. *J. Pharm. Sci.* 2018;21:225s–241s.
29. How C. W., Rasedee A., Manickam S., Rosli R. Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: Characterization, stability assessment and cytotoxicity. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2013;112:393–399
30. Lu G. W., Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: Kulkarni V. S., editor. Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. 1st ed. UK: William Andrew; 2010.
31. Abdelbary G., Haider M. In vitro characterization and growth inhibition effect of nanostructured lipid carriers for controlled delivery of Methotrexate. *Pharm. Dev. Technol.* 2013;18:1159–1168
32. Muller R. H., Ruhl D., Runge S., Schulze-Forster K., Mehnert W. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm. Res.* 1997; 14; 458–462.
33. Almeida H., Lobao P., Frigerio C. et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies of thermo responsive eyedrops based on the combination of nanostructured lipid carriers (NLC) and the polymer Pluronic F-127 for controlled delivery of ibuprofen. *Pharm. Dev. Technol.* 2017;22:336–349.
34. Bondi M. L., Craparo E. F., Giannoni G. et al. Nanostructured lipid carriers-containing anticancer compounds: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *Drug Deliv.* 2007;14:61–67.
35. Vitorino C., Almeida J., Goncalves L. M. et al. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: from experimental design to the molecular detail. *J. Control. Release.* 2013;167:301–314.
36. Müller R. H., Radtke M., Wissing S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 2002;242:121–128. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00180-1.
37. Jennings V., Gohla S. H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN®). *J. Microencapsul.* 2001;18:149–158.
38. Czajkowska-Kosnik A., Szekalska M., Winnicka K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. *Pharmacological Reports.* 2019;71:156–166.
39. Beloqui A., Solinis M. A., Rodriguez-Gascon A. et al. Nanostructured Lipid Carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2016;12(1):143–161.
40. Beloqui A. B., Solinis M. A., Rodriguez-Gascon A. et al. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomed – Nanotechnol.* 2016;12:143–161.
41. Purohit D. K., Nandgude T. D., Poddar S. S. Nano-lipid carriers for topical application: current scenario. *Asian J. Pharm.* 2016;9(5):1–9.
42. Nakatuka Y., Yoshida H., Fukui K., Matuzawa M. The effect of particle size distribution on effective zeta-potential by use of the sedimentation method. *Adv. Powder Technol.* 2015;26:650–656.
43. Negi L. M., Talegaonkar S., Jaggi M. et al. Surface engineered nanostructured lipid carriers for targeting MDR tumor: Part II. In vivo biodistribution, pharmacodynamic and hematological toxicity studies. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2014;123:610–615.
44. Zhang W., Li X., Ye T., Chen F. et al Design, characterization, and in vitro cellular inhibition and uptake of optimized genistein-loaded NLC for the prevention of posterior capsular opacification using response surface methodology. *Int. J. Pharm.* 2014;454(1):354–366.
45. Lin Y. K., Huang Z. R., Zhuo R. Z., Fang J. Y., Combination of calcipotriol and Methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *Int. J. Nanomedicine.* 2010;5:117–128.
46. Khajavinia A., Varshosaz J., Dehkordi A. J. Targeting etoposide to acute myelogenous leukaemia cells using nanostructured lipid carriers coated with transferrin. *Nanotechnology.* 2012;23(40):405101.
47. Han F., Li S., Yin R., Liu H., Xu L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.* 2008;315:210–216.
48. O'Driscoll C. M., Griffin B. T. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility the potential impact of lipid based formulations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:617–624.
49. Kovacevic A., Savic S., Vuleta G., Muller R. H., Keck C. M. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int. J. Pharm.* 2011;406(1–2):163–172.
50. Makeen H. A., Mohan S., Al-Kasim M. A. Sultan M. H., Albarraq A. A., Ahmed R. A., Alhazmi H. A., Alam M. I. Preparation, Characterization, and Anti-Cancer Activity of Nanostructured Lipid Carriers Containing Imatinib. *Pharmaceutics.* 2021;13:1086. DOI: 10.3390/pharmaceutics13071086.
51. Yu G., Ali Z., Khan A. S., Ullah K., Jamshaid H., Zeb A., Imran M., Sarwar S., Choi H.-G., ud Din F. Preparation, Pharmacokinetics, and Antitumor Potential of Miltefosine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *Int. J. Nanomedicine.* 2021;16:3255–3273. DOI: 10.2147/IJN.S299443.
52. Kim C. H., Kang T. H., Kim B. D., Lee T. H., Yoon H. Y., Goo Y. T., Choi Y. S., Kang M. J., Choi Y. W. Enhanced Docetaxel Delivery Using Sterically Stabilized RIPL Peptide-Conjugated Nanostructured Lipid Carriers: In Vitro and In Vivo Antitumor Efficacy Against SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Pharmaceutics.* 2020;583:119393. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119393.

53. Poonia N., Narang J. K., Lather V., Beg S., Sharma T., Singh B., Pandita D. Resveratrol loaded functionalized nanostructured lipid carriers for breast cancer targeting: Systematic development, characterization and pharmacokinetic evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019;181:756–766. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.004.
54. Jiang H., Pei L., Liu N., Li J., Li Z., Zhang S. Etoposide-loaded nanostructured lipid carriers for gastric cancer therapy. *Drug Delivery.* 2016;23(4):1379–1382. DOI: 10.3109/10717544.2015.1048491.
55. Cao C., Wang Q., Liu Y. Lung cancer combination therapy: doxorubicin and β-elemene co-loaded, pH-sensitive nanostructured lipid carriers. *Drug Design, development and Therapy.* 2019;13:1087–1098. DOI: 10.2147/dddt.s198003.
56. Akanda M., Getti G., Douroumis D. In vivo evaluation of nanostructured lipid carrier systems (NLCs) in mice bearing prostate cancer tumors. *Drug Delivery and Translational Research.* 2021. DOI: 10.1007/s13346-021-01095-1.
57. Zhou J., Guo B., Zhu W., Sui X., Ma X., Qian J., Cao L., Han C. Novel biomimetic nanostructured lipid carriers for cancer therapy: preparation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2020;26(1):81–91. DOI: 10.1080/10837450.2020.1835957.
58. Nordin N., Yeap S. K., Rahman H. S. et al. In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. *Scientific report.* 2019;9:1614.
59. Zhou L., Chen Y., Zhang Z., He J., Du M., Wu Q. Preparation of tripteryne nanostructured lipid carriers and their absorption in rat intestine. *Pharmazie.* 2012;67(4):304–310.
60. Neupane Y. R., Srivastava M., Ahmad N. et al. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of Decitabine: Formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. *Int. J. Pharm.* 2014;477(1–2):601–612.
61. Zhang X. Y., Qiao H., Ni J. M., Shi Y. B., Qiang Y. Preparation of isoliquiritigenin-loaded nanostructured lipid carrier and the in vivo evaluation in tumor-bearing mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;49(3):411–422.
62. Qu C. Y., Zhou M., Chen Y. et al. Engineering of lipid prodrug-based, hyaluronic acid-decorated nanostructured lipid carriers platform for 5-fluorouracil and cisplatin combination gastric cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine.* 2015;10:3911–3920.
63. Patel A. R., Chougule M. B., Ian T. et al. Efficacy of aerosolized Celecoxib encapsulated nanostructured lipid carrier in non-small cell lung cancer in combination with Docetaxel. *Pharm. Res.* 2013;30(5):1435–1446.
64. Wang Ya., Zhang H., Hao J. et al. Lung cancer combination therapy: co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. *Drug Deliv.* 2016;23(4):1398–1403.
65. Neupane Y. R., Srivastava M., Ahmad N. et al. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of Decitabine: Formulation design, characterization, ex-vivo, and in vivo assessment. *Int. J. Pharm.* 2014;477(1–2):601–612.
66. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002;54(5):631–651.
67. Wang Z.-P., Wu J.-B., Chen T.-S. et al. In vitro and in vivo antitumor efficacy of berberine-nanostructured lipid carriers against H22 tumor. *Biophotonics and Immune Responses X.* 2015;(9324).
68. Khajavinia A., Varshosaz J., Dehkordi A. J. Targeting etoposide to acute myelogenous leukaemia cells using nanostructured lipid carriers coated with transferrin. *Nanotechnology.* 2012;23(40):405101.
69. Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi H., Andalib S. Synthesis of octadecylamine-retinoic acid conjugate for enhanced cytotoxic effects of 5-FU using LDL targeted nanostructured lipid carriers. *Eur. J. Med. Chem.* 2012;54:429–438.
70. Khan A., Imam S. S., Ajil M., Ahad A., Sultana Y., Ali A., Khan K. Brain Targeting of Temozolomide via the Intranasal Route Using Lipid-Based Nanoparticles: Brain Pharmacokinetic and Scintigraphic Analyses. *Mol. Pharmaceutics.* 2016;13:3773–3782.
71. Nandvikar N. Y., Lala R. R., Shinde A. S. Nanostructured lipid carrier: the advanced lipid carriers. *IJPSR.* 2019;10(12):5252–5265.
72. Zhang X., Pan W., Gan L. et al. Preparation of a Dispersible PEGylate Nanostructured Lipid Carriers (NLC) Loaded with 10-Hydroxycamptothecin by Spray-Drying. *Chemical and pharmaceutical bulletin.* 2008;56:1645–1650.
73. Sahoo L. Nanostructured lipid carrier (NLC)—a promising drug delivery for transdermal application. *J. Pharm. Sci Res.* 2020;12:475–487.
74. Devi D. R., Sandhya P., Hari B. N. V. Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2013;5(8):159–165.
75. Garg J., Pathania K., Sah S. P., Pawar S. V. Nanostructured lipid carriers: a promising drug carrier for targeting brain tumours. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2022;8:25.
76. Naseri N., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Adv. Pharm. Bull.* 2015;5:305–313.
77. Das S., Chaudhury A. Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12:62–76.
78. Shirkhedkar A. A., Patil P. S. Breakthroughs in transdermal nanostructured lipid carrier drug delivery systems. *IJPSR.* 2021;12(3):1352–1366.
79. Shi L., Li Z., Yu L., Jia H., Zheng L. Effects of surfactants and lipids on the preparation of solid lipid nanoparticles using double emulsion method. *J. Dispers. Sci. Technol.* 2011;32(2):254–259.
80. Charcosset C., El-Harati A., Fessi H. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J. Control Release.* 2005;108(1):112–120.
81. Thatipamula R. P., Palem C. R., Gannu R. Formulation and In vitro characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *DARU.* 2011;19(1):23–32.
82. Iqbal M. A., Md S., Sahni J. K., Baboota S., Dang S., Ali J. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. *J. Drug Target.* 2012;20(10):813–830.
83. Trotta M., Debernardi F., Caputo O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 2003;257:153–160.
84. Sahoo L., Patro C. S., Jena G. K., Patro N., Satapathy S. A Focus on Fabrication, Characterization, Stability, Skin Targeting, Patent, Safety and Toxicity of Nanostructured Lipid Carrier. *Journal of pharmaceutical research international.* 2022;34(17B):49–76.
85. Haider M., Abdin S. M., Kamal L., Orive G. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):288.
86. Rizwanullah M., Ahmad J., Amin S. Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Platform for Chemotherapeutics. *Current Drug Delivery.* 2016;13(1):4–26.
87. Subramaniam B., Siddik Z. H., Nagoor N. H. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *J. Nanopart. Res.* 2020;22:141.
88. Ranpise H. A., Gujar K. N., Pawar S. C., Awasthi R., Dua K., Mathure D., Madan J. R. Formulation, optimization, and evaluation of ketoconazole loaded nanostructured lipid carrier gel for topical delivery. *Drug Deliv. Lett.* 2020;10:61–71.
89. Kanojia N., Sharma N., Gupta N., Singh S. Applications of Nanostructured Lipid Carriers: Recent Advancements and Patent Review. *Biointerface research in applied chemistry.* 2022;12(1):638–652.
90. Ruktanonchai U., Bejrapha P., Sakulku U., Opanasopit P., Bunnaphraphatsara N., Junyaprasert V., Puttipipatkhachorn S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10(1):227–234.
91. Fang M., Jin Y., Bao W., Gao H., Xu M., Wang D., Wang X., Yao P., Liu L. In vitro characterization and in vivo evaluation of nanostructured lipid curcumin carriers for intragastric administration. *Int. J. Nanomedicine.* 2012;7:5395–5404.
92. Hommoss A. Preservative system development for argan oil-loaded nanostructured lipid carriers. *Pharmazie.* 2011;66(3):187–191.



## Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества

К. А. Гусев<sup>1</sup>✉, Д. Н. Маймистов<sup>1</sup>, В. И. Павловский<sup>2,3</sup>, А. Р. Алиев<sup>1</sup>, А. В. Павловский<sup>2</sup>,  
О. В. Иванова<sup>3</sup>, Д. О. Цыренов<sup>3</sup>, Е. В. Флисюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

<sup>3</sup> ООО «Инновационные фармакологические разработки» (ООО «Ифар»), 634021, Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, д. 79/4

✉ Контактное лицо: Гусев Константин А. E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

ORCID: К. А. Гусев – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; Д. Н. Маймистов – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; В. И. Павловский – <https://orcid.org/0000-0002-4583-6245>; А. Р. Алиев – <https://orcid.org/0000-0003-0010-0119>; А. В. Павловский – <https://orcid.org/0000-0003-3786-6388>; О. В. Иванова – <https://orcid.org/0000-0002-6192-2653>; Д. О. Цыренов – <https://orcid.org/0000-0002-3533-580X>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 25.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Растворимость активного фармацевтического ингредиента играет ключевую роль в усвоении лекарств. Экструзия горячего расплава – это периодический или непрерывный процесс, который позволяет создавать твердые дисперсные системы на основе различных носителей с целью повышения растворимости и биодоступности действующих веществ. Создание эффективных и безопасных обезболивающих средств является одной из актуальнейших задач органической и медицинской химии. В работе использован инновационный анальгетик неопиоидного типа действия с очень низкой токсичностью и низкой дозировкой, но практически не растворимый в воде. С целью повышения биодоступности было предложено получить твердую дисперсию методом экструзии горячего расплава.

**Цель.** Разработка технологии экструзии горячего расплава для получения твердой дисперсной системы действующего вещества PAV-0056 и полимера носителя Plasdone™ S-630 с целью повышения растворимости.

**Материалы и методы.** PAV-0056 – метил-2-(7-нитро-2-оксо-5-фенил-3-пропокси-2,3-дигидро-1Н-бензо[е][1,4]диазепин-1-ил)ацетат (АО «Органика», Россия); Plasdone™ S-630 (Boai NKY Pharmaceuticals Ltd., Китай); ПЭГ-1500 (Clariant, Швейцария); ацетонитрил для хроматографии (Thermo Fisher Scientific, Германия). Экструдаты получали на двухшнековом лабораторном экструдере с сонаправленным вращением шнеков HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия). Экструдаты исследовали методом оптической микроскопии, методом дифференциальной сканирующей калориметрии, определяли время стабильности водного раствора. Количественное содержание действующего вещества и родственных примесей в 2,5 % твердой дисперсии PAV-0056 определяли методом ВЭЖХ-УФ.

**Результаты и обсуждение.** Установлены условия проведения процесса экструзии горячего расплава для смеси 2,5 % PAV-0056 и Plasdone™ S-630. Исследована стабильность раствора экструдата в воде, определено содержание действующего вещества и примесей в экструдатах. На основе бинарной смеси разработан состав, содержащий 10 % ПЭГ-1500, выбраны оптимальные условия проведения процесса экструзии для получения твердой дисперсной системы, удовлетворяющей требованиям нормативной документации по содержанию действующего вещества и примесей.

**Заключение.** Бинарная смесь оказалась непригодна для создания ТДС методом экструзии горячего расплава из-за значительного накопления примесей в процессе экструзии. За счет добавления ПЭГ-1500 в состав композиции удалось значительно понизить рабочую температуру процесса, уменьшить содержание примесей в экструдате и сохранить удовлетворительную стабильность раствора PAV-0056 в воде.

**Ключевые слова:** обезболивающие, анальгетик, 1,4-бензодиазепин, экструзия горячего расплава, экструдат, твердая дисперсия, растворимость, биодоступность

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

**Вклад авторов.** В. И. Павловский разработал и создал активную молекулу, разработал и внедрил на АО «Органика» (г. Новокузнецк) технологию получения активной субстанции PAV-0056. К. А. Гусев разработал план эксперимента. К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов и А. Р. Алиев реализовали получение экструдатов методом экструзии горячего расплава. О. В. Иванова и Д. О. Цыренов определяли количественное содержание субстанции PAV-0056 и образующихся примесей в экструдате. Все авторы обрабатывали полученные данные, участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

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

**Благодарность.** Авторы благодарят АО «Органика» (г. Новокузнецк) за предоставление субстанции PAV-0056.

**Для цитирования:** Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Павловский В. И., Алиев А. Р., Павловский А. В., Иванова О. В., Цыренов Д. О., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):108–115. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115>

# Development of the Composition and Technology for Production a Solid Dispersion System by Hot Melt Extrusion to Increase the Bioavailability of the Active Substance

Konstantin A. Gusev<sup>1</sup>, Denis N. Maimistov<sup>1</sup>, Victor I. Pavlovsky<sup>2,3</sup>, Andrey R. Aliev<sup>1</sup>, Alexander V. Pavlovsky<sup>2</sup>, Olga V. Ivanova<sup>3</sup>, Denis O. Tsyrenov<sup>3</sup>, Elena V. Flisyuk<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia

<sup>3</sup> LLC "Innovative Pharmacology Research", 79/4, Elizarovikh str., Tomsk, 634021, Russia

✉ Corresponding author: Konstantin A. Gusev. E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

ORCID: Konstantin A. Gusev – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; Denis N. Maimistov – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; Victor I. Pavlovsky – <https://orcid.org/0000-0002-4583-6245>; Andrey R. Aliev – <https://orcid.org/0000-0003-0010-0119>; Alexander V. Pavlovsky – <https://orcid.org/0000-0003-3786-6388>; Olga V. Ivanova – <https://orcid.org/0000-0002-6192-2653>; Denis O. Tsyrenov – <https://orcid.org/0000-0002-3533-580X>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 06.09.2022

Revised: 25.10.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** The solubility of an active pharmaceutical ingredient plays a major role in drug absorption. Hot melt extrusion is a batch or continuous process that allows creating solid dispersion systems based on various carriers in order to increase solubility and bioavailability of active substances. Development of effective and safe analgesics is one of the most vital tasks of organic and medicinal chemistry. An innovative non-opioid analgesic with very low toxicity and low dosage, but practically insoluble in water, was used in this work. It was suggested to obtain a solid dispersion by hot melt extrusion in order to increase bioavailability.

**Aim.** Development a hot melt extrusion technology for production of a solid dispersion system of PAV-0056 as an active substance and Plasdone™ S-630 as a polymeric carrier to increase the solubility.

**Materials and methods.** PAV-0056 (methyl-2-(7-nitro-2-oxo-5-phenyl-3-propoxy-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-1-yl)acetate) (JSC "Organica", Russia) Figure 1; Plasdone™ S-630 (Boai NKY Pharmaceuticals Ltd., China); PEG-1500 (Clariant, Switzerland); acetonitrile for chromatography (Thermo Fisher Scientific, Germany). Extrudates were obtained using a HAAKE™ MiniCTW co-rotating twin-screw laboratory extruder (Thermo Fisher Scientific, Germany). Extrudates were examined by optical microscopy and differential scanning calorimetry, and time of water solution stability was determined. The quantitative content of the active substance and related impurities in the 2.5 % solid dispersion of PAV-0056 was determined by HPLC-UV.

**Results and discussion.** Hot melt extrusion process conditions were established for a mixture of 2.5 % PAV-0056 and Plasdone™ S-630. Stability of the extrudate solution in water was studied, the content of the active substance and impurities in the extrudates was determined. Based on the binary mixture, a composition containing 10 % of PEG-1500 was developed. The optimal conditions for the extrusion process were chosen for obtaining a solid dispersion system that meets the requirements of the regulatory documentation for the content of the active substance and impurities.

**Conclusion.** The binary mixture proved to be unsuccessful for the creation of SDS by hot melt extrusion due to significant accumulation of impurities during the extrusion process. By adding PEG-1500 to the composition, it was possible to considerably lower the operating temperature of the process, reduce the impurity content in the extrudate, and maintain satisfactory stability of the PAV-0056 solution in water.

**Keywords:** analgesic, 1,4-benzodiazepine, hot melt extrusion, extrudate, solid dispersion, solubility, bioavailability

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

**Contribution of the authors.** Victor I. Pavlovsky designed and created the active molecule; he also developed the technology for the production of the PAV-0056 active substance and implemented it at Organica JSC (Novokuznetsk). Konstantin A. Gusev designed the experiment plan. Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov and Andrey R. Aliev produced extrudates by hot melt extrusion. Olga V. Ivanova and Denis O. Tsyrenov quantified the content of PAV-0056 and resulting impurities in the extrudate. All authors processed the data obtained, participated in the discussion of results and wrote the manuscript.

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

**Acknowledgment.** The authors are grateful to Organica JSC (Novokuznetsk) for providing the PAV-0056 substance.

**For citation:** Gusev K. A., Maimistov D. N., Pavlovsky V. I., Aliev A. R., Pavlovsky A. V., Ivanova O. V., Tsyrenov D. O., Flisyuk E. V. Development of the composition and technology for production a solid dispersion system by hot melt extrusion to increase the bioavailability of the active substance. *Drug development & registration.* 2022;11(4):108–115. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115>

## ВВЕДЕНИЕ

Существует ряд подходов для повышения растворимости АФИ: микронизация субстанции, создание липосомальных форм [1], добавление поверхностно-активных веществ [2] и полимеров [3], абсорбция на мезопористых носителях [4]. Одним из наиболее перспективных технологических методов реализации вышеперечисленных подходов является экструзия горячего расплава (ЭГР) [5, 6].

Экструзия горячего расплава – это непрерывный или периодический процесс, который включает плавление, смешение, гомогенизацию, и продавливание материала через матрицу при нагревании.

Экструзия действующего вещества с полимером-носителем используется для решения широко спектра технологических задач, например, маскировка вкуса лекарств [7–9], улучшение растворимости [10–14], создание контролируемого высвобождения [15]

и для адресной доставки лекарств. Более значимо, как уже показано в ряде исследований и патентов, применение ЭГР для создания твердых дисперсных систем (ТДС) с целью повышения растворимости и биодоступности (БД) плохо растворимых действующих веществ (ДВ). ТДС представляет собой систему полимер ДВ, в которой твердое вещество, АФИ, либо растворяется в расплавленном полимере, образуя твердый раствор за счет нагрева до температуры близкой к температуре плавления, и энергии механического сдвига, либо равномерно диспергируется по всей массе полимера-носителя. При этом АФИ может переходить в аморфное состояние или оставаться кристаллическим.

Также для создания ТДС используется метод выпаривания растворителя, который успешно применяется для исследовательских и лабораторных задач. Однако, данная технология имеет множество недостатков и менее актуальна для промышленного производства. В тоже время ЭГР может обеспечить непрерывный процесс, не содержит растворителей, является высокопроизводительным процессом, для него доступны расчетные методы масштабирования, а оборудование занимает небольшую площадь. Основными недостатками экструзионной технологии являются: высокие температуры процесса и необходимость последующей обработки экструдата.

В последние годы интерес к технологии ЭГР быстро растет, о чем свидетельствуют публикации и патенты. Сегодня эта технология активно применяется для промышленного производства препаратов компаниями AbbVie, Abbott, Merck и другими [16]. В российской фармацевтической промышленности она находится на начальном этапе внедрения [17]. Экструзия горячего расплава может использоваться для производства различных лекарственных форм (ЛФ), например: гранулы [18], пеллеты [19], пленки [20], таблетки [21], а также трансдермальные [22], трансмукозальные [23] и подкожные имплантаты [24]. Несмотря на то, что ЭГР имеет значительный потенциал для повышения растворимости плохо растворимых ДВ, лишь несколько разработок были коммерциализированы [18]. Тем не менее, постепенно вводится в обращение все больше лекарственных препаратов на основе ЭГР, что показывает изменение тенденции в перспективных разработках фармацевтических компаний.

Создание эффективных и безопасных обезболивающих средств является одной из актуальнейших задач органической и медицинской химии. Нами создан [25] анальгетик нового типа действия, который работает по неопиоидному типу действия, и не является антагонистом циклооксигеназы. Вероятный механизм действия – антагонизм брадикинина. Разработанное соединение обладает низкой токсичностью и оказывает действие при невысоких дозировках, что особенно актуально в случае длительного применения. На основе доклинических исследований установлено, что данное соединение (рисунок 1) обладает

такими свойствами при ЕД<sub>50</sub> = 0,01 мг/кг, с очень низкой токсичностью ЛД<sub>50</sub> составляет более 2000 мг/кг. С целью повышения биодоступности и оценки возможности промышленного производства было предложено получить твердую дисперсию методом экструзии горячего расплава.

**Целью работы** является разработка технологии экструзии горячего расплава для получения твердой дисперсной системы действующего вещества PAV-0056 и полимера носителя Plasdone™ S-630 с целью повышения биодоступности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

PAV-0056 – метил-2-(7-нитро-2-оксо-5-фенил-3-пропокси-2,3-дигидро-1Н-бензо[е][1,4]диазепин-1-ил)ацетат (АО «Органика», Россия) рисунок 1; Plasdone™ S-630 (Boai NKY Pharmaceuticals Ltd., Китай); ПЭГ-1500 (Clariant, Швейцария); ацетонитрил для хроматографии (Thermo Fisher Scientific, Германия).

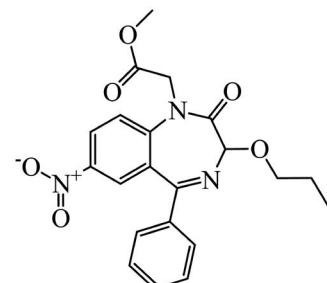


Рисунок 1. PAV-0056 – метил-2-(7-нитро-2-оксо-5-фенил-3-пропокси-2,3-дигидро-1Н-бензо[е][1,4]диазепин-1-ил)ацетат

Figure 1. PAV-0056 – (methyl-2-(7-nitro-2-oxo-5-phenyl-3-propoxy-2,3-dihydro-1H-benzod[1,4]diazepin-1-yl)acetate)

**Оборудование:** двухшнековый лабораторный экструдер HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия) с сонаправленными коническими шнеками, дифференциальный сканирующий калориметр DSC 3+ (Mettler Toledo, Швейцария); микроскоп оптический «Биомед ЗИ», с микровидеокамерой ScopeTec DCM 510 (ООО «Биомед», Россия); жидкостный хроматограф LC-20AD Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония).

**Количественное содержание действующего вещества и родственных примесей в 2,5 % твердой дисперсии** PAV-0056 определяли методом ВЭЖХ-УФ, разработанным в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ICH Q3A «Impurities in New Drug Substances» и ICH Q3B «Impurities in New Drug Products».

Для проведения испытаний готовили раствор с номинальной концентрацией действующего вещества 0,3 мг/мл в смеси ацетонитрил:вода (3:2) и хро-

матографировали его 3 раза в градиентном режиме на жидкостном хроматографе LC-20AD Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония) в следующих условиях, представленных в таблице 1:

**Таблица 1. Условия хроматографирования ТДС PAV-0056**

**Table 1. Chromatography conditions SDS PAV-0056**

Колонка Column	Kromasil C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Akzo Nobel GmbH, Нидерланды) Kromasil C18, 250 × 4.6 mm, 5 µm (Akzo Nobel GmbH, Netherlands)
ПФ А MP A	Вода очищенная Pure water
ПФ Б MP B	Ацетонитрил Acetonitrile
Температура колонки Column temperature	35 °C
Скорость потока Flow rate	1,0 мл/мин 1,0 ml/min
Детектор Detector	Спектрофотометрический, 260 нм Spectrophotometric, 260 nm
Объем пробы Sample volume	20 мкл 20 µl
<i>Программа градиента Gradient programme</i>	
Время, мин Time, min	ПФ Б, % MP B, %
0	50
20	95
22	95
24	50
29	50

Время удержания пика действующего вещества составило около 10,4 мин, содержание каждой единичной примеси вычисляли методом нормализации. Содержание действующего вещества в исходном образце рассчитывали относительно раствора стандартного образца в концентрации эквивалентной испытуемому раствору. В качестве стандартного образца использовали первичный стандарт предприятия с аттестованным содержанием действующего вещества 99,8 %.

**Методика определения времени выпадения осадка PAV-0056.** Навеску 100 мг твердой дисперсии PAV-0056 растворяют в конической плоскодонной колбе в 100 мл дистиллированной воды при комнатной температуре и визуально регистрируют появление осадка PAV-0056 на дне колбы в виде тонких игольчатых кристаллов.

**Методика проведения дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).** Метод состоял из трех последовательных сегментов: нагрев, охлаждение, нагрев в диапазоне от 0 до 150 °C.

Изменение температуры производилось с интенсивностью 10 К/мин, в среде азота с расходом 50 мл/мин. Использовались тигли алюминиевые стандартные на 40 мкл с перфорацией. Калибровку по температуре и энталпии проводили по чистым ме-

таллам – индию (МЕ-119442) и цинку (МЕ-119441) в соответствии с инструкциями производителя.

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

**Методика получения экструдатов.** Брали точные навески полимера-носителя и действующего вещества. Навеску Plasdone™ S-630 делили примерно на две равные части, первую часть переносили в ступку сразу, затем к ней добавляли полную навеску PAV-0056, тщательно перемешивали пестиком без принудительного истирания компонентов. После этого вносили оставшуюся часть навески Plasdone™ S-630 и повторяли процесс перемешивания.

После этого, полученная смесь, разделялась на несколько навесок (~6 грамм каждая), помещалась в полимерную тару и укупоривалась плотной крышкой для минимизации поглощения влаги из воздуха.

Смесь загружалась с помощью металлического шпателя в зону загрузки материального цилиндра экструдера вручную, постепенно, малыми порциями. Равномерность загрузки контролировалась по крутящему моменту на шнеках. Фиксировался рабочий крутящий момент, при котором через матрицу стабильно экструдировался обработанный состав.

Экструдат вытягивался вручную, для упрощения последующего измельчения диаметр выдерживался в диапазоне от 0,5 до 1,2 мм. Для транспортировки полученные нити разделяли на фрагменты длиной 30–40 мм и помещали в полиэтиленовые ZIP-пакеты.

Эксперименты при различных температурах проводились после полного цикла очистки экструдера (полная разборка, удаление предыдущего состава, мойка, сушка, сборка).

В серии экспериментов были установлены постоянными следующие параметры: состав загружаемой смеси, скорость вращения шнеков (20 об/мин), диаметр выходного отверстия матрицы (0,5 мм), направление вращения шнеков (сонаправленное) и геометрия шнеков (конические, комплектные HAAKE™ MiniCTW).

**Методика измельчения ПЭГ-1500.** Для работы был получен ПЭГ-1500, который представляет собой пластинки шириной от 3 до 7 мм и толщиной 0,5 мм. Для получения однородной смеси была разработана методика измельчения ПЭГ-1500.

Для измельчения использовался метод на основе замораживания исходного вещества, измельчения и последующего разделения на отдельные фракции путем просеивания.

ПЭГ-1500 фасовали по полиэтиленовым ZIP-пакетам 100 × 100 мм, толщина пленки 36 мкм. Фасовали таким образом, чтобы материал мог свободно и равномерно распределиться по площади пакета (100×100 мм) толщиной не более 3 мм. После этого, замороженную при -24 °C массу, в пакете прокатывали стеклянным валиком на стеклянной основе.

Далее частично измельченную массу выдерживали при комнатной температуре, объединяли и просе-

ивали через сита с ячейкой 0,5 мм и 1 мм последовательно. С оставшейся крупной фракцией повторяли измельчение 2–3 раза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения рабочих температур экструзии горячего расплава PAV-0056, действующее вещество было охарактеризовано методом ДСК, который продемонстрировал, что пик плавления приходится на 212 °C (см. рисунок 3) и после окончания плавления вещество начинает разлагаться. На основании этого максимальная температура экструзии PAV-0056 с полимером-носителем не должна превышать 200 °C.

Таким образом был установлен первичный температурный диапазон процесса экструзии от 140 °C (минимальная температура экструзии PVP/VA) до 200 °C (максимальная рабочая температура PAV-0056). Для определения оптимального температурного диапазона были выбраны точки 140, 160, 180 и 200 °C, в которых по методике получили экструдат, содержащий действующее вещество, и экструдат чистого полимера-носителя в качестве образца сравнения.

Полученные образцы были исследованы методами ВЭЖХ, оптической микроскопии и определено время стабильности водного раствора. Результаты испытаний приведены в таблице 2.

**Таблица 2. Параметры экструдата PAV-0056 и Plasdone™ S-630**

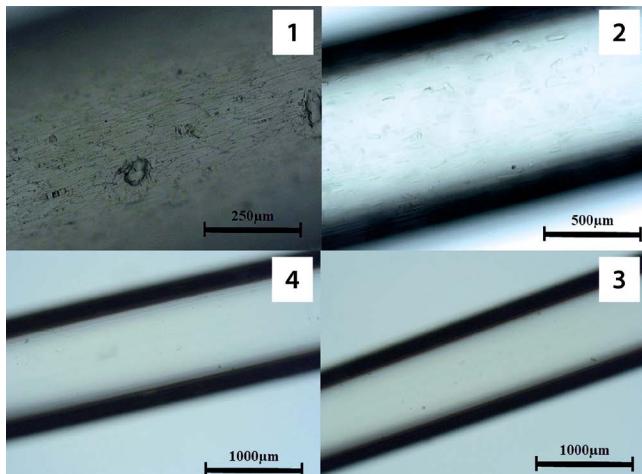
**Table 2. Extrudate parameters PAV-0056 and Plasdone™ S-630**

№	$T_{\text{экструзии}}, ^\circ\text{C}$ $T_{\text{extrusion}}, ^\circ\text{C}$	Время выпадения осадка, ч Sedimentation time, h	Содержание PAV-0056, % PAV-0056 content, %	Примеси, % Impurities, %
1	140	0	$2,40 \pm 0,03$	$1,24 \pm 0,02$
2	160	4	$2,36 \pm 0,02$	$1,70 \pm 0,03$
3	180	4	$2,39 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,02$
4	200	36	$2,36 \pm 0,03$	$1,24 \pm 0,02$

При растворении образца, полученного при 140 °C кристаллы PAV-0056 выпали в осадок сразу. Удовлетворительные результаты по времени стабильности раствора показал образец экструдата, полученный при 200 °C, но в процессе экструзии происходит значительное накопление примесей. На рисунке 2 представлены оптические микрофотографии экструдатов, у образца 1 наблюдается непрозрачность и характерная для частично расплавленного полимера текстура поверхности, у образца 2 видны кристаллы действующего вещества на поверхности и в массе полимера, образцы 3 и 4 полностью прозрачны, есть незначительные непрозрачные включения.

Для снижения содержания примесей, образующихся в процессе экструзии горячего расплава, содержащего PAV-0056, было принято решение понизить рабочую температуру процесса.

Для понижения рабочих температур и потенциального повышения растворимости PAV-0056 в полимере-носителе предложено в состав композиции



**Рисунок 2. Оптические микрофотографии экструдатов PAV-0056 / Plasdone™ S-630**

**Figure 2. Optical microphotograph of PAV-0056 / Plasdone™ S-630 extrudates**

внести ПЭГ-1500, который обладает пластифициирующими свойствами и понижает рабочую температуру экструзии PVP/VA.

Добавление каждого 5 % ПЭГ-1500 к PVP/VA позволяет понизить температуру экструзии на 10–20 °C, исходя из этого выбраны начальные температуры для получения образцов для ПЭГ-1500 5 % – 120 °C, для ПЭГ-1500 10 % – 100 °C.

В процессе экструзии, который проводился в одном цикле от низшей температуры выбранного диапазона к высшей, отслеживалось качество загрузки материала в материальный цилиндр, крутящий момент на шнеках и время, затраченное на экструзию. Также визуально оценивался полученный экструдат.

Для температур, при которых была минимальная производительность и высокая вязкость расплава (не полное расплавление PVP/VA) не проводилась наработка значительного количества экструдата и увеличивалась температура материального цилиндра до следующей точки эксперимента.

Образцы состава Plasdone™ S-630 / PAV-0056 2,5 % / ПЭГ-1500 5 % после определения примесей не дали необходимого эффекта, так как значимой разницы с бинарной смесью не было обнаружено.

Образцы состава Plasdone™ S-630 / PAV-0056 2,5 % / ПЭГ-1500 10 % продемонстрировали значительное улучшение показателя стабильности водного раствора действующего вещества и приемлемое значение примесей в соответствии с нормативной документацией (таблица 3).

Образец № 17 был охарактеризован методом ДСК для уточнения фазового состояния PAV-0056 в полимере-носителе. На ДСК-кривой ТДС № 17 не наблюдается отдельного пика, соответствующего PAV-0056 (рисунок 3), что может свидетельствовать о нахождении действующего вещества в аморфной форме.

**Таблица 3. Параметры экструдата**  
**Plasdone™ S-630 / PAV-0056 2,5 % / ПЭГ-1500 10 %**

**Table 3. Extrudate parameters**  
**Plasdone™ S-630 / PAV-0056 2.5 % /PEG-1500 10 %**

№	$T_{\text{экструзии}}, ^\circ\text{C}$ $T_{\text{extrusion}}, ^\circ\text{C}$	Время выпадения осадка, ч Sedimentation time, h	Содержание PAV-0056, % PAV-0056 content, %	Примеси, % Impurities, %
14	100	0,67	—	—
15	120	0,67	—	—
16	140	3,33	$2,51 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,01$
17	160	28,33	$2,66 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,01$
18	180	>49	$2,58 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,02$

Таким образом оптимальным вариантом оказался образец № 17, для которого затем провели наработку экструдата для дальнейших испытаний.

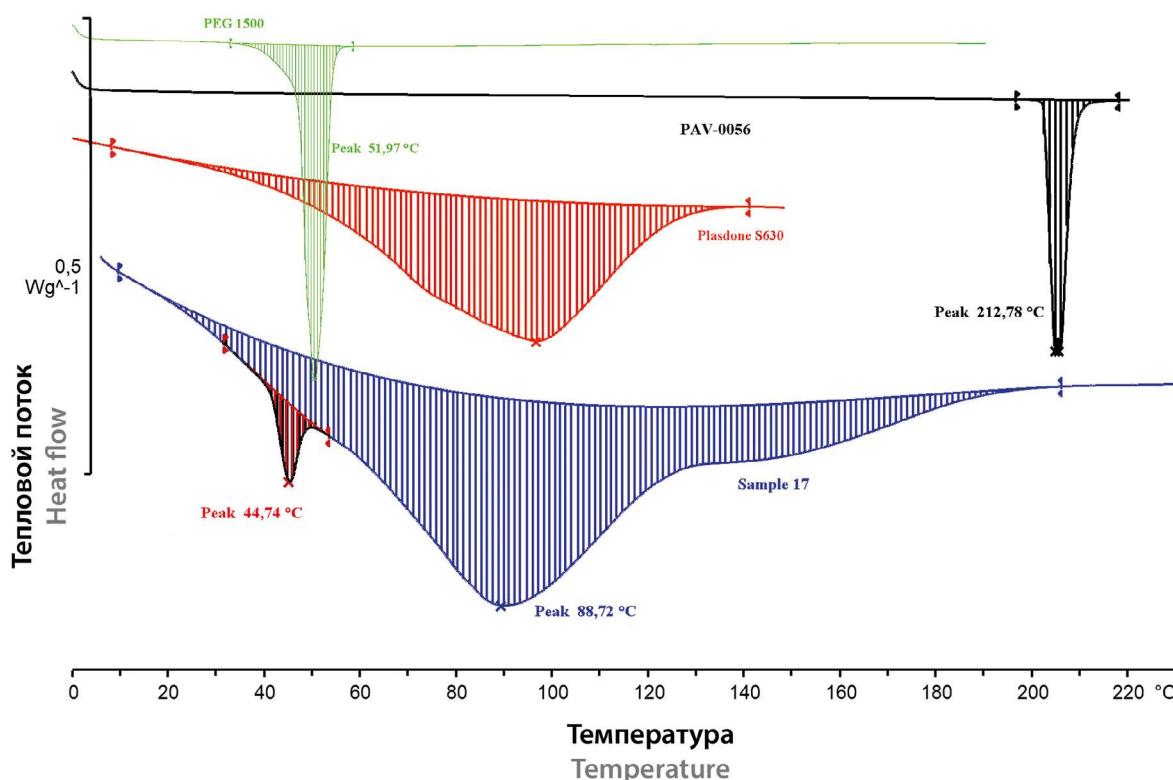
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бинарная смесь оказалась непригодна для создания ТДС методом экструзии горячего расплава из-за значительного накопления примесей в процессе экструзии.

За счет добавления ПЭГ-1500 в состав композиции удалось значительно понизить рабочую температуру процесса, уменьшить содержание примесей в экструдате и сохранить удовлетворительную стабильность раствора PAV-0056 в воде.

## ЛИТЕРАТУРА

- Лугэнь Б., Дмитриева М. В., Орлова О. Л., Краснюк И. И., Краснюк (мл.) И. И., Боков Д. О., Степанова О. И., Беляцкая А. В. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):21–26. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26.
- Сокуренко М. С., Кречетов С. П., Олифер С. А., Краснюк И. И., Соловьёва Н. Л., Макаренко М. А., Демина Н. Б. Разработка состава и технологии капсул с ресвератролом. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019;8(4):16–19. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-16-19.
- Демченко Д. В., Джайн (Корсакова) Е. А., Балабаньян В. Ю., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(4):79–87. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
- 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-84-89.
- Verma S., Rudraraju V. S. A systematic approach to design and prepare solid dispersions of poorly water-soluble drug. *AAPS PharmSciTech.* 2014;15(3):641–657. DOI: 10.1208/s12249-014-0093-z.
- Pina M. F., Zhao M., Pinto J. F., Sousa J. J., Craig D. Q. The influence of drug physical state on the dissolution enhancement of solid dispersions prepared via hot-melt extrusion: a case study using olanzapine. *J Pharm Sci.* 2014;103(4):12–23. DOI: 10.1002/jps.23894.
- Malaquias L. F. B., Sá-Barreto L. C. L., Freire D. O., Silva I. C. R., Karan K., Durig T., Lima E. M., Marreto R. N., Gelfuso G. M., Gratiere T., Cunha-Filho M. Taste masking and rheology improvement of drug complexed with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin by hot-melt extrusion. *Carbohydr Polym.* 2018;185:19–26. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.011.



**Рисунок 3. ДСК-кривые: PAV-0056, Plasdone™ S-630, ПЭГ-1500 и ТДС образец 17**

**Figure 3. DSC curves: PAV-0056, Plasdone™ S-630, PEG-1500 and SDS sample 17**

8. Tan D. C. T., Ong J. J., Gokhale R., Heng P. W. S. Hot melt extrusion of ion-exchange resin for taste masking. *Int J Pharm.* 2018;547(1–2): 385–394. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.068.
9. Keating A. V., Soto J., Tuleu C., Forbes C., Zhao M., Craig D. Q. M. Solid state characterisation and taste masking efficiency evaluation of polymer based extrudates of isoniazid for paediatric administration. *Int J Pharm.* 2018;536(2):536–546. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.008.
10. McFall H., Sarabu S., Shankar V., Bandari S., Murthy S. N., Kolter K., Langley N., Kim D. W., Repka M. A. Formulation of aripiprazole-loaded pH-modulated solid dispersions via hot-melt extrusion technology: In vitro and in vivo studies. *Int J Pharm.* 2019;554:302–311. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.005.
11. Vasoya J. M., Desai H. H., Gumaste S. G., Tillotson J., Kelemen D., Dalrymple D. M., Serajuddin A. T. M. Development of Solid Dispersion by Hot Melt Extrusion Using Mixtures of Polyoxylglycrides With Polymers as Carriers for Increasing Dissolution Rate of a Poorly Soluble Drug Model. *J Pharm Sci.* 2019;108(2):888–896. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.09.019.
12. Zhao Y., Xie X., Zhao Y., Gao Y., Cai C., Zhang Q., Ding Z., Fan Z., Zhang H., Liu M., Han J. Effect of plasticizers on manufacturing ritonavir/copovidone solid dispersions via hot-melt extrusion: Preformulation, physicochemical characterization, and pharmacokinetics in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2019;127:60–70. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.10.020.
13. Schittny A., Ogawa H., Huwyler J., Puchkov M. A combined mathematical model linking the formation of amorphous solid dispersions with hot-melt-extrusion process parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;132:127–145. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.09.011.
14. Xi L., Song H., Wang Y., Gao H., Fu Q. Lacidipine Amorphous Solid Dispersion Based on Hot Melt Extrusion: Good Miscibility, Enhanced Dissolution, and Favorable Stability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(7):3076–3084. DOI: 10.1208/s12249-018-1134-9.
15. Vo A. Q., Feng X., Morott J. T., Pimparade M. B., Tiwari R. V., Zhang F., Repka M. A. A novel floating controlled release drug delivery system prepared by hot-melt extrusion. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;98:108–121. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.11.015.
16. Simões M. F., Pinto R. M. A., Simões S. Hot-melt extrusion in the pharmaceutical industry: toward filing a new drug application. *Drug Discov Today.* 2019;24(9):1749–1768. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.013.
17. Хазанова Е. С., Ногай С. Ю., Филиппова Е. А. Пероральная твердая лекарственная форма с миофенольной кислотой или ее солью для использования в качестве иммунодепрессанта для лечения или предупреждения отторжения трансплантата органа или ткани и способ ее получения. Патент РФ на изобретение № RU 2670447 С2. 17.11.2016. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/WO2018093289A1> Ссылка активна на 01.09.2022.
18. Zhang Q., Zhao Y., Zhao Y., Ding Z., Fan Z., Zhang H., Liu M., Wang Z., Han J. Effect of HPMCAS on recrystallization inhibition of nimodipine solid dispersions prepared by hot-melt extrusion and dissolution enhancement of nimodipine tablets. *Colloids Surf B BioInterfaces.* 2018;172:118–126. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.030.
19. Hörmann T. R., Jäger N., Funke A., Mürb R. K., Khinast J. G., Paudel A. Formulation performance and processability window for manufacturing a dual-polymer amorphous solid dispersion via hot-melt extrusion and strand pelletization. *Int J Pharm.* 2018;553(1–2):408–421. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.035.
20. Pimparade M. B., Vo A., Maurya A. S., Bae J., Morott J. T., Feng X., Kim D. W., Kulkarni V. I., Tiwari R., Vanaja K., Murthy R., Shivakumar H. N., Neupane D., Mishra S. R., Murthy S. N., Repka M. A. Development and evaluation of an oral fast disintegrating anti-allergic film using hot-melt extrusion technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:81–90. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.06.004.
21. Melocchi A., Loretto G., Del Curto D. M., Maroni A., Gazzaniga A., Zema L. Evaluation of Hot-Melt Extrusion and Injection Molding for Continuous Manufacturing of Immediate-Release Tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2015;104(6):1971–1980. DOI: 10.1002/jps.24419.
22. Nasr M., Karandikar H., Abdel-Aziz R. T. A., Moftah N., Paradkar A. Novel nicotinamide skin-adhesive hot melt extrudates for treatment of acne. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(12):1165–1173. DOI: 10.1080/17425247.2018.1546287.
23. Alhijjaj M., Bouman J., Wellner N., Belton P., Qi S. Creating Drug Solubilization Compartments via Phase Separation in Multicomponent Buccal Patches Prepared by Direct Hot Melt Extrusion-Injection Molding. *Mol Pharm.* 2015;12(12):4349–62. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00532.
24. Salmoria G. V., Sibilia F., Henschel V. G., Fare S., Tanzi M. C. Structure and properties of polycaprolactone/ibuprofen rods prepared by melt extrusion for implantable drug delivery. *Polymer Bulletin.* 2017;74:4973–4987. DOI: 10.1007/s00289-017-1999-x.
25. Павловский В. И., Хазанов В. А., Станкевич С. А. Производные 1,4-бензодиазепин-2-она и их применение. Международный патент WO 19/103658 A3. 29 Декабря 2018. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/WO2019103658A3/?q=WO+19%2f103658+A3.+> Ссылка активна на 01.09.2022.

## REFERENCES

1. Lugen B., Dmitrieva M. V., Orlova O. L., Krasnyuk I. I., Krasnyuk (jr.) I. I., Bokov D. O., Stepanova O. I., Belyackaya A. V. Development of a Liposomal Dosage Form Based on Hydrophobic Derivative of Indolocarbazole. *Drug development & registration.* 2020;9(3):21–26. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26.
2. Sokurenko M. S., Krechetov S. P., Olifer S. A., Krasnyuk I. I., Solovyova N. L., Makarenko M. A., Demina N. B. Development of Composition and Technology of Resveratrol Capsules. *Drug development & registration.* 2019;8(4):16–19. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-16-19.
3. Demchenko D. V., Jain (Korsakova) E. A., Balabanyan V. Yu., Makarova M. N., Makarov V. G. Development and Biopharmaceutical Evaluation of Tablets Based on the Poorly Water-soluble Substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. *Drug development & registration.* 2020;9(4):79–87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
4. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-84-89.
5. Verma S., Rudraraju V. S. A systematic approach to design and prepare solid dispersions of poorly water-soluble drug. *AAPS PharmSciTech.* 2014;15(3):641–657. DOI: 10.1208/s12249-014-0093-z.
6. Pina M. F., Zhao M., Pinto J. F., Sousa J. J., Craig D. Q. The influence of drug physical state on the dissolution enhancement of solid dispersions prepared via hot-melt extrusion: a case study using olanzapine. *J Pharm Sci.* 2014;103(4):12–23. DOI: 10.1002/jps.23894.
7. Malaquias L. F. B., Sá-Barreto L. C. L., Freire D. O., Silva I. C. R., Karan K., Durig T., Lima E. M., Marreto R. N., Gelfuso G. M., Gratierei T., Cunha-Filho M. Taste masking and rheology improvement of drug complexed with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin by hot-melt extrusion. *Carbohydr Polym.* 2018;185:19–26. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.011.
8. Tan D. C. T., Ong J. J., Gokhale R., Heng P. W. S. Hot melt extrusion of ion-exchange resin for taste masking. *Int J Pharm.* 2018;547(1–2): 385–394. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.068.
9. Keating A. V., Soto J., Tuleu C., Forbes C., Zhao M., Craig D. Q. M. Solid state characterisation and taste masking efficiency evaluation of polymer based extrudates of isoniazid for paediatric administration. *Int J Pharm.* 2018;536(2):536–546. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.008.
10. McFall H., Sarabu S., Shankar V., Bandari S., Murthy S. N., Kolter K., Langley N., Kim D. W., Repka M. A. Formulation of aripiprazole-loaded pH-modulated solid dispersions via hot-melt extrusion technology: In vitro and in vivo studies. *Int J Pharm.* 2019;554:302–311. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.005.
11. Vasoya J. M., Desai H. H., Gumaste S. G., Tillotson J., Kelemen D., Dalrymple D. M., Serajuddin A. T. M. Development of Solid Dispersion by Hot Melt Extrusion Using Mixtures of Polyoxylglycrides With Polymers as Carriers for Increasing Dissolution Rate of

- a Poorly Soluble Drug Model. *J Pharm Sci.* 2019;108(2):888–896. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.09.019.
12. Zhao Y., Xie X., Zhao Y., Gao Y., Cai C., Zhang Q., Ding Z., Fan Z., Zhang H., Liu M., Han J. Effect of plasticizers on manufacturing ritonavir/copovidone solid dispersions via hot-melt extrusion: Preformulation, physicochemical characterization, and pharmacokinetics in rats. *Eur J Pharm Sci.* 2019;127:60–70. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.10.020.
13. Schitny A., Ogawa H., Huwyler J., Puchkov M. A combined mathematical model linking the formation of amorphous solid dispersions with hot-melt-extrusion process parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;132:127–145. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.09.011.
14. Xi L., Song H., Wang Y., Gao H., Fu Q. Lacidipine Amorphous Solid Dispersion Based on Hot Melt Extrusion: Good Miscibility, Enhanced Dissolution, and Favorable Stability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(7):3076–3084. DOI: 10.1208/s12249-018-1134-9.
15. Vo A. Q., Feng X., Morott J. T., Pimparade M. B., Tiwari R. V., Zhang F., Repka M. A. A novel floating controlled release drug delivery system prepared by hot-melt extrusion. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;98:108–121. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.11.015.
16. Simões M. F., Pinto R. M. A., Simões S. Hot-melt extrusion in the pharmaceutical industry: toward filing a new drug application. *Drug Discov Today.* 2019;24(9):1749–1768. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.013.
17. Khazanova E. S., Nogaj S. Y., Filippova E. A. Peroral solid dosage form with mycophenolic acid or its salt for use as an immunodepressant for treatment or prevention of organ or tissue transplant rejection and method for production thereof. Patent RU № 2670447 C2. 17.11.2016. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2018093289A1/> Accessed: 01.09.2022. (In Russ.)
18. Zhang Q., Zhao Y., Zhao Y., Ding Z., Fan Z., Zhang H., Liu M., Wang Z., Han J. Effect of HPMCAS on recrystallization inhibition of nimodipine solid dispersions prepared by hot-melt extrusion and dissolution enhancement of nimodipine tablets. *Colloids Surf B BioInterfaces.* 2018;172:118–126. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.030.
19. Hörmann T. R., Jäger N., Funke A., Mürb R. K., Khinast J. G., Paudel A. Formulation performance and processability window for manufacturing a dual-polymer amorphous solid dispersion via hot-melt extrusion and strand pelletization. *Int J Pharm.* 2018;553(1–2):408–421. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.035.
20. Pimparade M. B., Vo A., Maurya A. S., Bae J., Morott J. T., Feng X., Kim D. W., Kulkarni V. I., Tiwari R., Vanaja K., Murthy R., Shivakumar H. N., Neupane D., Mishra S. R., Murthy S. N., Repka M. A. Development and evaluation of an oral fast disintegrating anti-allergic film using hot-melt extrusion technology. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;119:81–90. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.06.004.
21. Melocchi A., Loret G., Del Curto D. M., Maroni A., Gazzaniga A., Zema L. Evaluation of Hot-Melt Extrusion and Injection Molding for Continuous Manufacturing of Immediate-Release Tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2015;104(6):1971–1980. DOI: 10.1002/jps.24419.
22. Nasr M., Karandikar H., Abdel-Aziz R. T. A., Moftah N., Paradkar A. Novel nicotinamide skin-adhesive hot melt extrudates for treatment of acne. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(12):1165–1173. DOI: 10.1080/17425247.2018.1546287.
23. Alhijjaj M., Bouman J., Wellner N., Belton P., Qi S. Creating Drug Solubilization Compartments via Phase Separation in Multicomponent Buccal Patches Prepared by Direct Hot Melt Extrusion-Injection Molding. *Mol Pharm.* 2015;12(12):4349–62. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00532.
24. Salmoria G. V., Sibilia F., Henschel V. G., Fare S., Tanzi M. C. Structure and properties of polycaprolactone/ibuprofen rods prepared by melt extrusion for implantable drug delivery. *Polymer Bulletin.* 2017;74:4973–4987. DOI: 10.1007/s00289-017-1999-x.
25. Pavlovsky V. I., Khazanov V. A., Stankevich S. A. 1,4-benzodiazepin-2-one derivatives and use thereof. World patent № WO 19/103658 A3. 29.12.2018. Available at: [https://patents.google.com/patent/WO2019103658A3/ru?oq=WO+19%2f103658+A3.+/">https://patents.google.com/patent/WO2019103658A3/ru?oq=WO+19%2f103658+A3.+/](https://patents.google.com/patent/WO2019103658A3/) Accessed: 01.09.2022. (In Russ.)



## **Разработка силиконовых форм, полученных с применением аддитивных технологий, для отливки ректальных суппозиториев**

**К. А. Гусев<sup>✉</sup>, О. А. Терентьева, Д. Н. Маймистов, Ю. Э. Генералова,  
К. О. Сидоров, Е. В. Флисюк**

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Гусев Константин А. E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

**ORCID:** К. А. Гусев – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; О. А. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>; Д. Н. Маймистов – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-573-1719>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

**Статья поступила:** 06.09.2022

**Статья принята в печать:** 26.10.2022

**Статья опубликована:** 25.11.2022

### **Резюме**

**Введение.** В современной практике суппозитории изготавливают методами ручного формования или выливания. Трехмерная печать позволяет преодолеть недостатки традиционных способов изготовления суппозиториев и отсутствие персонализации. Этот подход позволяет изготавливать суппозитории, содержащие действующие вещества, без специальных форм или другой физической поддержки, но представленные на данный момент разработки имеют ряд ограничений и требуют значительного времени на печать одного суппозитория. В данной работе предлагается метод, использующий трехмерное моделирование и печать, который позволит получать персонализированные суппозитории методом выливания.

**Цель.** Разработка силиконовых форм для получения суппозиториев различного размера и формы методом выливания из гидрофильных, липофильных и дифильных основ.

**Материалы и методы.** Суппозиторные основы: масло какао (Luker, Колумбия), полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500 (Merck KGaA, Германия), ПЭГ-400 (Merck KGaA, Германия), Витепсол Н-15 (ООО ТД «ХИММЕД», Россия); действующее вещество: парацетамол (Hebei Jiheng (Group) Pharmaceutical Co. Ltd., Китай); филаменты для 3D-печати: полиэтилентерефталат (PET-G натуральный, ООО «ПринтПродакт», Россия); силикон двухкомпонентный платиновый, твердость Шор 30А (Китай); растворители: ацетонитрил HPLC grade (Merck KGaA, Германия). Проектирование суппозиториев, форм для отливки и мастер-форм проводили в системе автоматизированного проектирования КОМПАС-3D версии 17.1. Мастер-формы печатали на 3D-принтерах Picaso PRO 250 (PICASO 3D, Россия), Picaso X Pro (PICASO 3D, Россия). Мастер-формы заполняли смесью двухкомпонентного силикона для получения сегментов форм. Суппозитории получали методом выливания в изготовленные формы, определяли их среднюю массу и стандартное отклонение. Определение парацетамола в суппозиториях проводили методом УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре UV-1240 mini (Shimadzu, Япония). Силиконовые формы очищали с помощью замачивания и отмывки в горячей воде с применением поверхностно-активных веществ.

**Результаты и обсуждение.** Модельной формой суппозиториев была выбрана торпедовидная форма. Для выбранной формы было спроектировано три объема суппозиториев: 3,32 мл; 1,5 мл и 0,25 мл. Для всех объемов были спроектированы и изготовлены силиконовые формы. Отлитые суппозитории были исследованы на соответствие нормативной документации на лекарственную форму, была оценена средняя масса и однородность массы. Были изготовлены суппозитории, содержащие действующее вещество – парацетамол. Разработана методика очистки полученных силиконовых форм.

**Заключение.** Разработанные силиконовые формы позволяют получать суппозитории, соответствующие нормативной документации на лекарственную форму. Силиконовые формы обладают рядом значительных преимуществ по сравнению с аналогами из металла или полимерных материалов.

**Ключевые слова:** ректальные суппозитории, силикон, послойное наплавление, трехмерная печать, аддитивное производство, персонализированная медицина

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

**Вклад авторов.** К. А. Гусев, О. А. Терентьева, Д. Н. Маймистов придумали и разработали план эксперимента. К. А. Гусев и Д. Н. Маймистов разработали конструкцию форм. О. А. Терентьева изготовила образцы суппозиториев. Ю. Э. Генералова разработала методику и определяла количественное содержание парацетамола в суппозиториях. Все авторы обрабатывали полученные данные, участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

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

**Для цитирования:** Гусев К. А., Терентьева О. А., Маймистов Д. Н., Генералова Ю. Э., Сидоров К. О., Флисюк Е. В. Разработка силиконовых форм, полученных с применением аддитивных технологий, для отливки ректальных суппозиториев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):116–124. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-116-124>

# Development of Suppositories Silicone Molds Using Additive Technologies

Konstantin A. Gusev<sup>✉</sup>, Oksana A. Terenteva, Denis N. Maimistov, Yuliya E. Generalova,  
Kirill O. Sidorov, Elena V. Flisyuk

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Konstantin A. Gusev. E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

ORCID: Konstantin A. Gusev – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; Oksana A. Terenteva – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>;  
Denis N. Maimistov – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; Yuliya E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>;  
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 06.09.2022

Revised: 26.10.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** In modern practice, suppositories are prepared by hand rolling method or fusion. 3D printing can overcome the disadvantages of traditional suppository manufacturing methods and solve the problems of personalization. 3D printing makes it possible to manufacture drug-loaded suppositories without the use of molds or other physical support. The current studies have a number of limitations, and the printing of one suppository requires a long time. This report proposes a method of 3D modeling and 3D printing to produce personalized suppositories by fusion.

**Aim.** Various sizes and shapes suppositories silicone molds development by molding method from hydrophilic, lipophilic and amphiphilic bases.

**Materials and methods.** Suppository bases: cocoa butter (Luker, Colombia), polyethylene glycol (PEG) 1500 (Merck KGaA, Germany), PEG-400 (Merck KGaA, Germany), Witepsol H-15 (Chimmed Group, Russia); pharmaceutical substance: paracetamol (Hebei Jiheng (Group) Pharmaceutical Co. Ltd, China); filaments for 3D printing: polyethylene terephthalate (PET-G natural, LLC "PrintProdakt", Russia); silicone two-component platinum, hardness Shore 30A (China); solvents: Acetonitrile Grade HPLC (Merck KGaA, Germany). The design of the both casting and master molds of suppositories was carried out using the KOMPAS-3D version 17.1. Master molds were printed by Picaso PRO 250 and Picaso X Pro 3D printers. Mold segments were obtained by filling master molds with a mixture of two-component silicone. Suppositories were obtained by molding method. Their average weight and standard deviation were determined. Paracetamol concentration in suppositories was carried out by UV spectrophotometry on a UV-1240 mini spectrophotometer (Shimadzu, Япония). Silicone molds were soaked and washed in hot water with surfactants. Washouts from the molds were taken by soaking the mold.

**Results and discussion.** The torpedo-shaped form was chosen as the model form of suppositories. For the chosen form, three volumes of suppositories were designed: 3.32 ml; 1.5 ml and 0.25 ml. Silicone molds were designed and manufactured for all volumes. The cast suppositories were examined for compliance with the regulatory documentation for the dosage form, the average weight and mass uniformity were evaluated. Suppositories with paracetamol were made. A procedure for cleaning the obtained silicone molds has been developed.

**Conclusion.** The resulting silicone molds make it possible to obtain suppositories in accordance with the regulatory documentation for the suppositories. Silicone molds have significant advantages compared to analogues of metal or polymeric molds.

**Keywords:** rectal suppositories, silicone, molding, 3D printing, additive manufacturing, personalized medicine

**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.** Konstantin A. Gusev, Oksana A. Terenteva, Denis N. Maimistov developed and carried out the experiment. The both Konstantin A. Gusev and Denis N. Maimistov developed the design of master forms. Oksana A. Terenteva produced suppositories. Yuliya E. Generalova developed a method of determination of the paracetamol quantitative content in suppositories. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

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

**For citation:** Gusev K. A., Terenteva O. A., Maimistov D. N., Generalova Yu. E., Sidorov K. O., Flisyuk E. V. Development of suppositories silicone molds using additive technologies. *Drug development & registration.* 2022;11(4):116–124. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-116-124>

## ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные вещества можно вводить различными путями в виде разных лекарственных форм (ЛФ). Пероральное введение лекарств не всегда эффективно, так как только часть введенного препарата может достичь необходимого места действия. Ректальная доставка может повысить терапевтическую эффективность и безопасность за счет локализации лекарственного средства (ЛС) в очаге заболевания [1–3].

Суппозитории представляют собой ЛФ, предназначенные для ректального, вагинального и уретрального применения для оказания местного или системного терапевтического действия [4]. Такой способ введения ЛС может быть необходим, когда другие не оказывают должного терапевтического эффекта, или вызывают сильные побочные эффекты, или просто затруднительны (например, бессознательное состояние человека, детский возраст, сильно ослабленные пациенты и др.).

В современной практике суппозитории изготавливают методами ручного формования или выливания. Метод формования представляет собой трудоемкий и длительный процесс, состоящий из нескольких стадий. Метод выливания требует значительного времени на этапе затвердевания суппозиторной массы.

Ряд очевидных недостатков традиционных способов изготовления суппозиториев позволяет преодолеть трехмерная печать. Термин «трёхмерная печать» был определен Международной организацией по стандартизации (ISO) как изготовление объектов путем нанесения материала с использованием печатающей головки, сопла или другой технологии печати [5]. В области фармацевтической промышленности трехмерная печать дает возможность внести значительный технологический вклад в разработку и производство лекарств [6, 7]. Данная технология позволяет разрабатывать новые ЛФ, системы доставки лекарств, создавать ткани и органы [8, 9]. Дополнительными преимуществами являются экономическая эффективность, высокая производительность, большой выбор объектов проектирования и производства [10].

Трехмерная печать позволяет изготавливать суппозитории, содержащие ЛС, без специальных форм или другой физической поддержки.

Так с применением технологий аддитивного производства, в частности методом послойного нанесения (semi-solid extrusion, SSE-печать), были напечатаны ректальные суппозитории на гидрофобной основе торпедообразной формы с таクロлимусом [3, 11]. Такой подход представляет особый интерес для препаратов с узким терапевтическим индексом [12], поскольку потребность в дозах может заметно различаться у пациентов разных возрастных групп, что увеличивает риск побочных эффектов. К недостаткам данного метода можно отнести продолжительное время печати одного суппозитория, время на замену картриджа или шприца, ограничения по весу суппозиториев. Время печати суппозиториев, напечатанных вертикально составляло 4 мин 30 сек., напечатанных горизонтально – 2 мин 16 сек. Однако горизонтально напечатанные суппозитории имели меньшее разрешение печати, в процессе происходила деформация слоев, которые не имели поддержки. Время застывания суппозиториев составляло в среднем 1 мин. Средний вес суппозиториев варьировался от 1,7 до 1,81 г.

Представлен ряд подходов основанных на применении трёхмерной печати для создания несъемных оболочек или форм для суппозиториев, получаемых методом выливания.

Оболочки с отверстием наверху для суппозиториев с артесунатом были напечатаны методом послойного наплавления из поливинилового спирта [16]. Они наполнялись суппозиторной массой через отверстие в оболочке с помощью иглы. Печать одной оболочки занимала 23 минуты, что говорит о значительном времени изготовления. Напечатанные суп-

позитории с артесунатом являются одним из вариантов превентивного лечения тяжелой малярии у детей в возрасте до 6 лет в отдаленных районах с тропическим климатом. Предполагается, что постепенное высвобождение артесуната за счет наличия оболочки, обеспечит пролонгированное действие артесуната и повысит его биодоступность у пациентов.

Группа ученых Y. Sun [13] разработала суппозитории для ректального и вагинального применения с анальгетиками из биополимеров, которые не плавятся при температуре человеческого тела и обладают способностью сопротивляться пластической деформации. Эти свойства позволяют суппозиториям оставаться в месте введения, оказывая терапевтический эффект. Суппозитории можно легко удалить, потянув за нитку, прикрепленную к ним. При вагинальном введении суппозитории могут оказывать пролонгированное терапевтическое действие на срок до нескольких недель. Формы для суппозиториев печатали по технологии послойного наплавления и наполняли их смесью биополимеров с ЛС.

Были получены водорастворимые суппозитории с контролируемым высвобождением прогестерона [14]. Оболочку суппозиториев печатали методом послойного наплавления из поливинилового спирта с разным количеством отверстий (0–2) в разных местах оболочки. Полученные формы заполняли суппозиторной массой вручную, предварительно заклеивая скотчем отверстия. Трехмерная печать позволила изменять дизайн оболочки и состав суппозиториев, но данный подход представляется трудоемким, длительным во времени и точность дозирования зависит от степени наполнения и плотности заклеивания отверстий.

Группой ученых M. Barsky [15] были напечатаны методом наплавления из полимолочной кислоты мастер-формы для отливки пессариев из медицинского силикона (MED-4940, Nusil) в соответствии с анатомическими особенностями конкретных пациентов. Данный метод позволил создать форму пессариев, отличную от стандартных форм, представленных на рынке.

Все авторы продемонстрировали, что трехмерная печать послужила полезным инструментом для создания персонализированных суппозиториев, отвечающих требованиям врачей и пациентов.

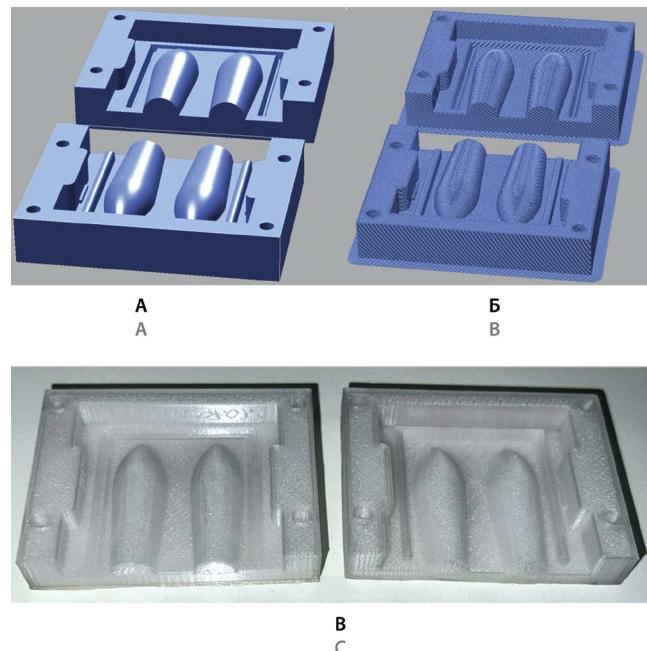
Персонализация суппозиториев заключается не только в выборе определенной дозировки ЛС, но и оптимизации геометрических размеров и формы. Разнообразие форм суппозиториев необходимо, чтобы обеспечить комплаенс пациентов, а также есть состояния, в которых стандартные типы суппозиториев не могут обеспечить безболезненное введение [16]. Последствия пластических операций и различных заболеваний могут менять анатомические особенности организма человека. В таких случаях необходимо изготовление суппозиториев индивидуальных размеров и геометрии [16].

На данный момент разработано программное обеспечение, которое позволяет адаптировать формы ректальных и вагинальных суппозиториев при создании трехмерных моделей к индивидуальным особенностям пациентов. Данная программа содержит поля для введения основной информации о пациенте (возраст, пол, вес, имеющиеся заболевания, предыдущий опыт ректального и вагинального введения суппозиториев), на основании которых предлагается оптимальная форма и рецептура ректальных и вагинальных суппозиториев для каждого конкретного пациента. Таким образом, предлагаемая форма ЛП полностью соответствовала бы состоянию больного, что позволяло бы минимизировать дискомфорт и затруднения при его применении [17].

Также оптимизация форм суппозиториев необходима в ветеринарной практике и при проведении доклинических исследований ЛП. Животные модели позволяют лучше понять механизмы заболеваний, но они лишь частично отражают сложность заболевания человека [18]. Суппозитории для доклинических исследований предназначены для введения мелким животным, таким как грызуны, поэтому необходимо приготовить их соответствующего размера и формы. Можно использовать технологии трехмерной печати, а можно разработать пресс-форму для удовлетворения потребности в суппозиториях меньшего размера и диаметра. Технология создания пресс-форм с помощью трехмерной печати позволяет производить суппозитории различного размера и формы с дозировкой, адаптированной под требования доклинического исследования [19]. Прямая печать суппозиториев является длительным процессом и ограничивается массой и геометрией получаемых форм. Применение персонализированных съемных форм для отливки суппозиториев поможет значительно ускорить и масштабировать процесс изготовления суппозиториев. А разработанные подходы по изготовлению мастер-форм и силиконовых форм для отливки суппозиториев помогут за короткое время получать суппозитории различной геометрии и размера в большом количестве (рисунок 1).

Перед созданием силиконовых форм для отливки суппозиториев, авторами данной работы были разработаны, напечатаны и апробированы пластиковые формы для отливки суппозиториев. Причиной для изменения технологии изготовления форм и разработке нового подхода стали существенные недостатки пластиковых форм, такие как низкая герметичность форм (расплавленная суппозиторная масса недостаточно хорошо удерживалась в форме), недолговечность форм (ресурс соответствовал 10–15 циклов очистки) и значительная стоимость изготовления большой партии форм, напечатанных на 3D принтере.

В качестве материала для изготовления форм был выбран пищевой двухкомпонентный платиновый силикон с твердостью 30 Шор А. В дальнейшем плани-



**Рисунок 1. Мастер-форма для суппозиториев:**

А – модель; Б – визуализация задания; В – напечатанный объект

**Figure 1. Suppositories mold:**

A – model; B – visualization 3D-printing g-code; C – printed mold

руется провести исследование на совместимость с требованиями, предъявляемыми к силиконам, используемым в фармацевтическом производстве.

Принимая во внимание вышеизложенное, можно сделать вывод, что использование трехмерной печати могло бы стать новым, более практичным, доступным и экономически приемлемым способом изготовления различных твердых ЛФ, и, что наиболее важно и востребовано, обеспечивающих персонализацию, в том числе для особых групп пациентов, включая педиатрическое и гериатрическое население, а также пациентов с определенными специфическими заболеваниями. Особенно перспективно выглядит внедрение таких технологий в рамках аптечного и госпитального производства лекарственных средств.

**Целью данной работы** являлась разработка силиконовых форм для получения суппозиториев различного размера и формы методом выливания из гидрофильтных, липофильтных и дифильтных основ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы:** суппозиторные основы: масло какао (Luker, Колумбия), полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500 (Merck, Германия), ПЭГ-400 (Merck KGaA, Германия), Вителпол Н-15 (ООО ТД «ХИММЕД», Россия); действующее вещество: парацетамол (Hebei Jiheng (Group) Pharmaceutical Co. Ltd., Китай); филаменты для 3D-печати: полиэтилентерефталат (PET-G натуральный,

ООО «ПринтПродакт», Россия); силикон двухкомпонентный платиновый, твердость Шор 30А (Китай); растворители: ацетонитрил HPLC grade (Merck KGaA, Германия).

**Проектирование форм** для отливки суппозиториев производили в программном обеспечении для автоматизированного проектирования (САПР) КОМПАС-3D версии 17.1. Для создания формы с нужным объемом суппозитория, была спроектирована модель суппозитория и были оценены ее геометрические характеристики средствами САПР КОМПАС-3D, рассчитан объем объекта. Полученный в результате проектирования модели суппозитория профиль вращения (рисунок 2) был перенесен на основу сегмента формы и применена операция вычитания методом вращения. В результате которой были получены в сегменте необходимые углубления (рисунок 3, поз. 2), соответствующие половине объема отливаемого суппозитория.

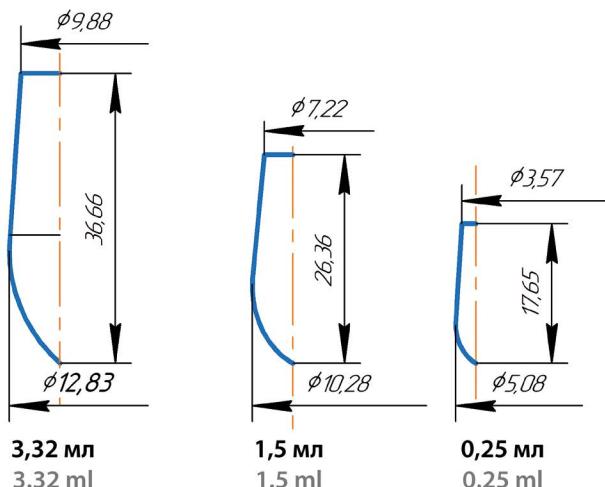


Рисунок 2. Профили вращения суппозиториев

Figure 2. Rotation profiles of suppositories

Размер основы для проектирования суппозитория выбирался минимально достаточным для размещения двух лунок под суппозитории с обоих сторон, а также для размещения системы позиционирования и уплотнения формы. Таким образом, была получена выполненная в размер цифровая модель сегмента формы для отливки суппозиториев (рисунок 3). Из двух таких сегментов собирается цельная форма для отливки суппозиториев. Данная форма спроектирована для отливки из двухкомпонентного силикона, методом литья при нормальном давлении.

**Мастер-формы для отливки двухкомпонентного силикона проектировались** в САПР КОМПАС-3D версии 17.1. В качестве основы для проектирования была использована деталь-заготовка сегмента формы для отливки суппозиториев. Для создания мас-

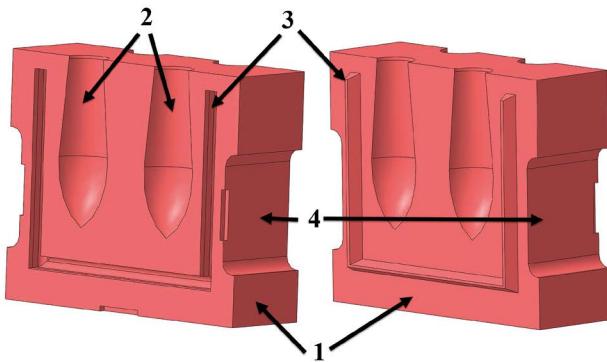


Рисунок 3. Сегмент формы для отливки суппозиториев, вид с двух сторон:

1 – тело формы; 2 – ячейки под суппозитории; 3 – пазогребневая система; 4 – паз для держателя

Figure 3. Suppositories mold segment, both sides view:

1 – mold body; 2 – cells for suppositories; 3 – keyhole system; 4 – slot for holder

тер-формы была спроектирована прямоугольная основа, внутри которой располагали деталь-заготовку. Ширину и высоту основы выбирали таким образом, чтобы в плоскости разделения мастер-формы была стенка достаточной толщины для формирования отверстий под винты М3. Толщина выбиралась с учетом максимальной толщины стенки не более 2 мм.

На следующем этапе проектирования применялась «булевая» операция с параметром «вычитание», которая позволила сформировать в основе углубление, полностью соответствующее исходной форме.

На завершающем этапе проектирования мастер-формы создавались отверстия для винтов крепления и модель рассекалась на две равные части по плоскости разборки, это необходимо для извлечения готового сегмента из формы.

Полученные мастер-формы изготавливали методом трехмерной печати по технологии FDM, для этого использовали 3D-принтеры Picaso PRO 250 (PICASO 3D, Россия) и Picaso X Pro (PICASO 3D, Россия), программное обеспечение для подготовки задания на печать Polygon X. Перед подготовкой задания для печати мастер-формы, исходная трехмерная модель разбивалась на две поверхности по линии разборки мастер-формы. Задание могло быть создано как для каждой половины отдельно, так и совместно. Основные параметры, определяющие процесс печати представлены в таблице 1.

После печати мастер-формы дополнительная механическая обработка потребовалась только для улучшения качества прилегания стенок в зоне стыковки фрагментов мастер-формы.

**Массы для заполнения мастер-формы** готовили путем смешения компонентов А и Б двухкомпонентного силикона в соотношении 1:1 по массе.

В емкость для смешивания компонентов отмеряли компонент А, необходимую навеску, далее к нему в ту же тару аккуратно добавляли точную навеску компонента Б. Такая схема необходима для получения высокой воспроизводимости результатов отливок. Смесь компонентов тщательно и интенсивно перемешивали в течении 120 секунд. Затем в исходной таре из смеси удаляли воздух путем вакуумной дегазации в экскаторе в течении 15 минут при постоянно работающем вакуумном насосе. В подготовленную мастер-форму (предварительно очищенную и собранную) аккуратно заливали смесь силикона. Заполнение формы производили таким образом, чтобы не допустить образования пузырьков воздуха или воздушных карманов.

**Таблица 1. Параметры печати мастер-форм****Table 1. Molds printing parameters**

Параметр Parameters	Значение Value
Материал Material	Полиэтилентерефталат (PET-G) Polyethylene terephthalate
Температура сопла, °C Nozzle temperature, °C	230
Температура стола, °C Build plate temperature, °C	90
Толщина слоя, мм Layer height, mm	0,1
Заполнение, % Infill, %	20
Скорость печати внешних стенок, мм/с Wall speed, mm/s	60
Скорость заполнения, мм/с Infill speed, mm/s	80
Открытая камера Open chamber	Да
Обдув модели, % Enable print cooling, %	100

Заполненную мастер-форму устанавливали на горизонтальную поверхность и выдерживали до полной полимеризации силикона в течении 6–8 часов.

После полимеризации мастер-форму разбирали и аккуратно извлекали полученную отливку. Отливка очищалась от вспомогательных фрагментов и отмывалась в горячей воде с мылом. После этого была пригодна для использования по назначению.

**Методика отливки суппозиториев.** Суппозиторную основу плавили на водяной бане и разливали по формам. Формы охлаждали при температуре +4 °C в течение 30–60 минут в зависимости от основы.

Для получения суппозиториев с действующим веществом брали масло какао и парацетамол в массовом соотношении 20:1. Масло какао плавили на водяной бане, смешивали с парацетамолом и выливали смесь в форму для суппозиториев. Формы охлаждали при температуре +4 °C в течение 40 минут.

**Определение средней массы** проводили в соответствии с Государственной Фармакопеей РФ XIV издания ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Статистическую обработку данных: вычисление средней массы и стандартного отклонения, проводили методом описательной статистики с помощью программного обеспечения Microsoft Excel для Mac, версия 16.61.1, модуль «Пакет инструментов анализа», «Описательная статистика».

**Определение парацетамола в суппозиториях** проводили методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 247 нм, где наблюдается максимум поглощения этого вещества. Для количественной оценки использовали метод градиуровочного графика. График строили в диапазоне концентраций 1 – 12 мкг/мл растворов парацетамола, в качестве растворителя использовали смесь воды и ацетонитрила в соотношении 1:1. Результаты метрологической оценки построенной прямой показывают наличие линейного отклика оптической плотности растворов парацетамола в диапазоне концентраций 1 – 12 мкг/мл, который был выбран в качестве аналитического диапазона.

Каждый суппозиторий взвешивали, помещали в химический стакан или плоскодонную колбу, добавляли 30 мл растворителя (вода:ацетонитрил, 1:1), емкость помещали на водяную баню температурой 40–45 °C для расплавления основы. После ее расплавления, емкость перемещали в морозилку для затвердевания масла какао на 15–20 минут. Емкость доставали, раствор количественно переносили в мерную колбу объемом 100 мл, а к оставшейся основе добавляли 20 мл растворителя и повторяли процедуру 2 раза, собирая раствор в одной мерной колбе. По завершении извлечения действующего вещества из суппозиторной основы, ее и стенки емкости омывали растворителем, собирая раствор в мерной колбе. Объем мерной колбы доводили до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали. Полученный раствор разбавляли до аналитической концентрации (в 150–500 раз) растворителем и проводили измерение оптической плотности.

После использования для отливки суппозиториев, **силиконовые формы** очищали с помощью замачивания и отмычки в горячей воде с применением поверхностно-активных веществ. Формы помещали в пластиковый контейнер, добавляли жидкое мыло, заливали горячей водой (60–70 °C), выдерживали не менее 10 минут, после чего воду сливали. Далее формы отмывали мыльной мягкой губкой в горячей воде до полного визуального отсутствия фрагментов суппозиторной массы после остывания форм. Для полноценной отмычки (особенно, при работе с липофильными основами) рекомендуется проводить не менее трёх циклов очистки форм.

**Смывы с форм** отбирались путем замачивания формы для отливки суппозиториев в 100 мл смеси вода-ацетонитрил (1:1) в течении 60 минут. После это-

го из объема была отобрана аликовта 50 мл, которая была исследована методом УФ-спектрофотометрии, на основе методики количественного определения парацетамола.

**Оборудование:** 3D принтер Picaso PRO 250 (PICASO 3D, Россия), Picaso X Pro (PICASO 3D, Россия), спектрофотометр UV-1240 mini (Shimadzu, Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Модельной формой суппозиториев была выбрана торпедовидная форма, так как она является наиболее популярной, но сложной для расчета изготовления и проектирования. При этом для данной формы суппозитории изготавливаются в широком диапазоне масс (от 0,5 до 4,0 грамм) и, следовательно, размеров.

Было выбрано три различных объема суппозиториев с сохранением формы: 3,32; 1,5 и 0,25 мл.

На первом этапе работы по проектированию форм для отливки суппозиториев решена задача расчета объема ячейки суппозитория. Профили вращения и основные размеры спроектированных суппозиториев представлены на рисунке 2.

Для улучшения качества отливки суппозитория в формы и для удобства их сборки, на сегментах форм была выполнена пазогребневая система (см. рисунок 3, поз. 3), которая одновременно герметизирует форму и упрощает процесс сборки и точного позиционирования сегментов, исключает их смещение. Для фиксации нескольких сегментов форм в цельную систему с несколькими ячейками был разработан специальный крепеж, который представляет собой пластиковую скобу с двумя защелками и пластину, которая фиксируется скобой и зажимает все сегменты форм.

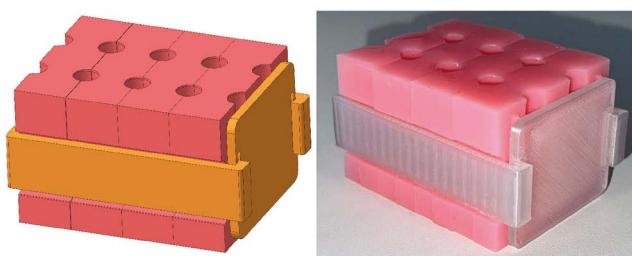
Система фиксации спроектирована таким образом, чтобы ее можно было легко установить на формы, снять и полностью разобрать без специальных устройств. Отдельно в конструкции заложен высокий ресурс использования защелок, так как при их работе необходимое усилие прижима обеспечивает незначительная деформация гребня оконечной силиконовой формы.

Модельная сборка из четырех сегментов форм вместе с системой фиксации представлена на рисунке 4: слева – 3D-модель, справа – рабочий образец.

Для изготовления сегментов форм были разработаны и напечатаны на 3D принтере мастер-формы для литья двухкомпонентного силикона. За счет особенностей PET (низкая температурная усадка и малые искажения геометрии при экструзии) и подобранных условий для высокого качества печати (см. таблица 1) было достигнуто высокое соответствие полости в мастер-форме с исходной трехмерной моделью. Применение в качестве материала мастер-формы PET позволяет использовать такую форму многократно без уменьшения качества получаемых отливок. На

рисунке 1 представлены 3D модель, визуализация задания для печати и полученная мастер-форма.

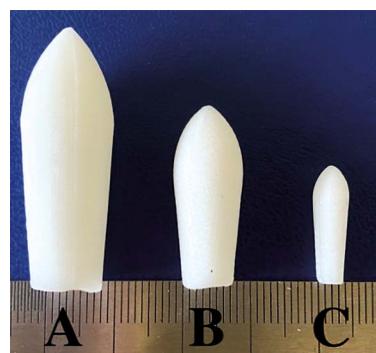
В результате работы были получены сегментарные формы из силикона для отливки суппозиториев объемом 3,32; 1,5 (рисунок 4) и 0,25 мл. Использование методов автоматизированного проектирования, аддитивных технологий (3D-печати) и литья двухкомпонентного силикона позволило ускорить процесс создания таких форм вплоть до 24 часов, от момента постановки задачи до получения минимально необходимого количества сегментов формы для отливки.



**Рисунок 4. Форма для отливки суппозиториев в сборе**

**Figure 4. Assembled suppositories molds**

Для оценки качества получаемых суппозиториев для каждого размера форм получили 20 образцов из Витепсола Н-15. Полученные суппозитории представлены на рисунке 5. Рассчитали среднюю массу, стандартное отклонение и сопоставили среднюю массу с расчётным объемом ячейки в форме, тем самым оценив плотность основы. Результаты представлены в таблице 2.



**Рисунок 5. Суппозитории объемом:**

**A – 3,32 мл; B – 1,5 мл; C – 0,25 мл**

**Figure 5. Suppositories:**

**A – 3.32 ml; B – 1.5 ml; C – 0.25 ml**

Дополнительно из каждого типа основ (Витепсол Н-15, ПЭГ-1500:ПЭГ-400 (95:5) и масло какао) было отлиты суппозитории-плацебо объемом 3,32 мл, для которых были оценены параметры однородности

массы, средней массы, стандартного отклонения и расчетной плотности основы. Результаты представлены в таблице 3.

**Таблица 2. Параметры суппозиториев различного объема из Витецсола Н-15**

**Table 2. Parameters of different volumes suppositories of Vitepsol N-15**

Параметр Parameter	Объем суппозиториев, мл Suppositories volume, ml		
	3,32	1,5	0,25
Средняя масса, г Average weight, g	2,882	1,289	0,215
Однородность массы, соответствие Uniformity of mass, matching	+	+	+
Максимальное отклонение по массе, % Maximum weight deviation, %	2,58	3,54	1,37
Стандартное отклонение, г Standard deviation, g	0,0497	0,0200	0,00189
Относительное отклонение, % Relative deviation, %	1,7	1,6	0,88
Плотность основы Base density	0,868	0,859	0,859

**Таблица 3. Параметры суппозиториев из различных основ объемом 3,32 мл**

**Table 3. Parameters of suppositories from different bases (V = 3,32 ml)**

Параметр Parameter	Тип основы Type of bases		
	Витецсол Н-15 Vitepsol N-15	Масло какао Cacao butter	ПЭГ-400:ПЭГ-400 (95:5) PEG-1500:PEG-400 (95:5)
Средняя масса, г Average weight, g	2,882	2,867	3,606
Однородность массы, соответствие Uniformity of mass, matching	+	+	+
Максимальное отклонение по массе, % Maximum weight deviation, %	2,58	2,81	1,07
Стандартное отклонение, г Standard deviation, g	0,0497	0,0373	0,0253
Относительное отклонение, % Relative deviation, %	1,7	1,3	0,7
Плотность основы Base density	0,868	0,864	1,086

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о высокой воспроизводимости по массе при отливке суппозиториев, наименьшее абсолютное отклонение по массе имели суппозитории с наименьшей массой.

В качестве доказательства применимости разработанных форм, были получены суппозитории, содержащие действующее вещество – парацетамол.

Согласно методике изготовления в каждой единице суппозитория должно содержаться 135 мг парацетамола. По результатам количественного определения парацетамола содержание действующего вещества составило ( $130,0 \pm 5,0$ ) мг.

С целью оценки сорбционных свойств изготовленных силиконовых форм, очищенных согласно методике, были взяты смывы.

В результате анализа образцов смывов на УФ-спектре отсутствовал максимум поглощения в области парацетамола, следовательно, содержание парацетамола в растворе не превышало 0,8 мкг/мл (согласно методике количественного определения). На основании чего можно сделать вывод о полноценной очистке форм от действующего вещества.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы были получены суппозитории объемом 3,32; 1,5 и 0,25 мл с помощью силиконовых форм, полученных методом литья в мастерформы, напечатанные на 3D-принтере. Испытания показали, что полученные суппозитории полностью соответствуют требованиям нормативной документации. Использование данного метода для получения суппозиториев позволяет создавать суппозитории различного размера и может позволить изготавливать персонализированные суппозитории.

Было показано, что разработанные силиконовые формы обладают значительными достоинствами по отношению к существующим аналогам: формы из силикона позволяют извлекать полученные суппозитории без специальной подготовки форм, за счет деформации силикона; отсутствует необходимость покрытия форм составами, уменьшающими адгезию суппозитория, то есть не нуждаются в смазывании; могут быть очищены без использования специальных средств.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Foppoli A., Maroni A., Moutaharrik S., Melocchi A., Zema L., Palugan L., Cerea M., Gazzaniga A. In vitro and human pharmacoscintigraphic evaluation of an oral 5-ASA delivery system for colonic release. *Int J Pharm.* 2019;572:118723. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118723.
2. Seoane-Viaño I., Gómez-Lado N., Lázare-Iglesias H., Rey-Bretal D., Lamela-Gómez I., Otero-Espinar F. J., Blanco-Méndez J., Antúnez-López J. R., Pombo-Pasín M., Aguiar P., Ruibal Á., Luzardo-Álvarez A., Fernández-Ferreiro A. Evaluation of the therapeutic activity of melatonin and resveratrol in Inflammatory Bowel Disease: A longitudinal PET/CT study in an animal model. *Int J Pharm.* 2019;572:118713. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118713.
3. Seoane-Viaño I., Ong J. J., Luzardo-Álvarez A., González-Barcia M., Basit A. W., Otero-Espinar F. J., Goyanes A. 3D printed tacrolimus suppositories for the treatment of ulcerative colitis. *Asian J Pharm Sci.* 2021;16(1):110–119. DOI: 10.1016/j.ajps.2020.06.003.

4. Ham A. S., Buckheit R. W. Designing and developing suppository formulations for anti-HIV drug delivery. *Therapeutic Delivery.* 2017;8(9):805–817. DOI: 10.4155/tde-2017-0056.
5. Jamróz W., Szafraniec J., Kurek M., Jachowicz R. 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. *Pharm Res.* 2018;35(9):176. DOI: 10.1007/s11095-018-2454-x.
6. Trenfield S. J., Awad A., Madla C. M., Hatton G. B., Firth J., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. Shaping the future: recent advances of 3D printing in drug delivery and healthcare. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019;16(10):1081–1094. DOI: 10.1080/17425247.2019.1660318.
7. Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Terent'eva O. A., Semin A. A. Additive Manufacturing Technologies for Pharmaceutics. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2018;51(11):1025–1029. DOI: 10.1007/s11094-018-1733-5.
8. Tappa K., Jammalamadaka U. Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *Journal of Functional Biomaterials.* 2018;9(1):17. DOI: 10.3390/jfb9010017.
9. Terenteva O. A., Gusev K. A., Tikhonova V. V., Maimistov D. N., Shandryuk G. A., Flisyuk E. V. Three-dimensional printing of ramipril tablets by fused deposition modeling. *Drug development & registration.* 2021;10(4):79–87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87.
10. Pravin S., Sudhir A. Integration of 3D printing with dosage forms: A new perspective for modern healthcare. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:146–154. DOI: 10.1016/j.bioph.2018.07.167.
11. Seoane-Viñao I., Gómez-Lado N., Lázaro-Iglesias H., García-Otero X., Antúnez-López J. R., Ruibal Á., Varela-Correa J. J., Aguiar P., Basit A. W., Otero-Espinar F. J., González-Barcia M., Goyanes A., Luzardo-Álvarez A., Fernández-Ferreiro A. 3D Printed Tacrolimus Rectal Formulations Ameliorate Colitis in an Experimental Animal Model of Inflammatory Bowel Disease. *Biomedicines.* 2020;8(12):563. DOI: 10.3390/biomedicines8120563.
12. Ud Din F., Choi J. Y., Kim D. W., Mustapha O., Kim D. S., Thapa R. K., Ku S. K., Youn Y. S., Oh K. T., Yong C. S., Kim J. O., Choi H.-G. Irinotecan-encapsulated double-reverse thermosensitive nanocarrier system for rectal administration. *Drug Deliv.* 2017;24(1):502–510. DOI: 10.1080/10717544.2016.1272651.
13. Sun Y., Ruan X., Li H., Kathuria H., Du G., Kang L. Fabrication of non-dissolving analgesic suppositories using 3D printed moulds. *Int J Pharm.* 2016;513(1–2):717–724. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.073.
14. Tagami T., Hayashi N., Sakai N., Ozeki T. 3D printing of unique water-soluble polymer-based suppository shell for controlled drug release. *Int J Pharm.* 2019;568:118494. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118494.
15. Barsky M., Kelley R., Bhora F. Y., Hardart A. Customized Pessary Fabrication Using Three-Dimensional Printing Technology. *Obstetrics & Gynecology.* 2018;131(3):493–497. DOI: 10.1097/AOG.0000000000002461.
16. Persaud S., Eid S., Swiderski N., Serris I., Cho H. Preparations of Rectal Suppositories Containing Artesunate. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):222. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030222.
17. Krežić S., Krhan E., Mandžuka E., Kovac N., Krajina D., Marić A., Komić S., Nikšić A., Tucak-Smajić A., Sirbubalo M., Vranic E. Fabrication of Rectal and Vaginal Suppositories Using 3D Printed Moulds: The Challenge of Personalized Therapy. *IFMBE Proceedings.* 2020;729–734. DOI: 10.1007/978-3-030-17971-7\_108.
18. Hatton G. B., Yadav V., Basit A. W., Merchant H. A. Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2747–2776. DOI: 10.1002/jps.24365.
19. Awad A., Fina F., Trenfield S. J., Patel P., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. 3D Printed Pellets (Miniprintlets): A Novel, Multi-Drug, Controlled Release Platform Technology. *Pharmaceutics.* 2019;11(4):148. DOI: 10.3390/pharmaceutics11040148.



## Разработка состава и технологии шипучих таблеток с биологически активным комплексом аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) плодов

Н. С. Пивоварова, О. Н. Абросимова<sup>✉</sup>, Т. С. Шебитченко, Н. В. Сокрашкина,  
А. А. Шмарова, Е. К. Новикова, К. О. Сидоров

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Абросимова Олеся Николаевна. E-mail: olesya.abrosimova@pharminnotech.com

ORCID: Н. С. Пивоварова – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; О. Н. Абросимова – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>;  
Т. С. Шебитченко – <https://orcid.org/0000-0003-1423-4492>; Н. В. Сокрашкина – <https://orcid.org/0000-0003-1825-0887>;  
А. А. Шмарова – <https://orcid.org/0000-0002-0191-7342>; Е. К. Новикова – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>; К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 26.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Актуальность использования растительного сырья в производстве лекарственных препаратов обусловлена разнообразием комплексов биологически активных веществ, входящих в их состав. Данные препараты обладают широким спектром терапевтических эффектов, и в связи с этим в настоящее время активно изучаются свойства и составы различного растительного сырья. Арония черноплодная (рябина черноплодная) на протяжении многих лет являлась объектом изучения ученых для выявления различных лечебных свойств, и в 2015 году ее свежие и сухие плоды представлены в качестве лекарственного растительного сырья в Государственной Фармакопее Российской Федерации XIV издания. Благодаря разнообразию комплексов биологически активных веществ, входящих в состав плодов аронии черноплодной, она применяется в различных сферах деятельности (пищевой и фармацевтической промышленности). Поэтому представляет интерес разработка состава и технологии шипучих таблеток, содержащих комплекс биологически активных веществ и обладающих следующими преимуществами: быстрое высвобождение активных ингредиентов, высокая скорость усвоения БАВ, удобство применения и приятный вкус.

**Цель.** Разработка состава и технологии шипучих таблеток с биологически активным комплексом из аронии черноплодной сухих плодов.

**Материалы и методы.** Извлечения, обогащенные антоцианами, получали из аронии черноплодной сухих плодов. В качестве вспомогательных веществ в технологии шипучих таблеток использовали: натрий углекислый кислый, винную кислоту, лактозу моногидрат, повидон (Plasdone™ K-29/32), полиэтиленгликоль-6000 и аспартам. В лабораторных условиях гранулят (кислотный и основной) получали методом продавливания влажных масс, где в качестве увлажнителя использовали извлечение (гранулят 1) и этиловый спирт 96 % (гранулят 2). Числовые показатели лекарственного растительного сырья (ЛРС), технологические свойства гранулята и массы для таблетирования, а также показатели качества шипучих таблеток определяли по методикам, описанным в ГФ РФ XIV.

**Результаты и обсуждение.** Определены числовые показатели аронии черноплодной сухих плодов (измельченность сырья и содержание посторонних примесей, общая зора в растительном сырье и зора, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание экстрактивных веществ) и подтверждена доброкачественность сырья, используемого на последующих этапах разработки лекарственного средства. Наработано извлечение, обогащенное антоцианами. Разработан состав и технология шипучих таблеток с раздельным гранулированием кислотных и основных компонентов. В качестве увлажнителей использовали извлечение и этиловый спирт 96 %, для улучшения вкусовых характеристик – аспартам. Предложен проект спецификации показателей качества шипучих таблеток на основе обогащенного извлечения.

**Заключение.** В ходе исследовательской работы определены числовые показатели лекарственного растительного сырья и подтверждено его качество, что позволило использовать его для дальнейшего получения извлечений. Выбраны условия экстрагирования, получены извлечения. Подобраны вспомогательные вещества, разработан состав и технология шипучих таблеток на основе извлечения из аронии черноплодной сухих плодов, предложен проект спецификации на шипучие таблетки в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV.

**Ключевые слова:** арония черноплодная, антиоксидант, шипучие таблетки, раздельная грануляция, ультразвуковая экстракция

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

**Вклад авторов.** Н. С. Пивоварова, Т. С. Шебитченко осуществил постановку задачи. Н. В. Сокрашкина выполнила эксперимента, обработка полученных данных. А. А. Шмарова, Н. С. Пивоварова, О. Н. Абросимова, Е. К. Новикова, К. О. Сидоров обсуждали результаты и написание 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:** Пивоварова Н. С., Абросимова О. Н., Шебитченко Т. С., Сокрашкина Н. В., Шмарова А. А., Новикова Е. К., Сидоров К. О. Разработка состава и технологии шипучих таблеток с биологически активным комплексом аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) плодов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4):125–133. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-125-133>

# Development of Composition and Technology of Effervescent Tablets with Biologically Active Complex of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) Fruits

Nadezhda S. Pivovarova, Olesya N. Abrosimova<sup>✉</sup>, Tatyana S. Shebitchenko,  
Natalya V. Sokrasnkina, Alexandra A. Shmarova, Ekaterina K. Novikova, Kirill O. Sidorov

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Olesya N. Abrosimova. E-mail: olesya.abrosimova@pharminnotech.com

ORCID: Nadezhda S. Pivovarova – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; Olesya N. Abrosimova – <https://orcid.org/0000-0002-0274-0139>;  
Tatyana S. Shebitchenko – <https://orcid.org/0000-0003-1423-4492>; Natalya V. Sokrasnkina – <https://orcid.org/0000-0003-1825-0887>;  
Alexandra A. Shmarova – <https://orcid.org/0000-0002-0191-7342>; Ekaterina K. Novikova – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>;  
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Received: 06.09.2022      Revised: 26.10.2022      Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** Actual use of plant raw materials in the production of medicines is caused by a variety of bioactive substance complexes in their composition. These drugs have a wide range of therapeutic effects and in this regard, the properties and compositions of various plant materials are currently being actively studied. Aronia melanocarpa (chokeberry) has been the focus of scientific research for many years to identify various healing properties, and in 2015 its fresh and dried fruits are presented as a plant raw material in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. The variety of biologically active substance complexes of Aronia melanocarpa fruit allows its use in different fields (food and pharmaceutical industries). For this reason, the development of the composition and technology of effervescent tablets containing a complex of biologically active substances and possessing the following advantages: rapid release of active ingredients, high rate of BAS assimilation, usability and pleasant flavor are of interest.

**Aim.** The aim of the present study is to develop the composition and technology of effervescent tablets with a biologically active complex from dried Aronia melanocarpa fruits.

**Materials and methods.** Extracts enriched with anthocyanins were obtained from dried chokeberry fruits. As excipients in the technology of effervescent tablets, sodium carbonate, tartaric acid, lactose monohydrate, povidone (Plasdone™ K-29/32), polyethylene glycol 6000 and aspartame were used. Under laboratory conditions, granules (acidic and basic) were obtained by the method of punching wet masses, where extract (granulate 1) and ethyl alcohol 96 % (granulate 2) were used as a moisturizer. Numerical indicators of medicinal plant raw materials, technological properties of granulate and tabletting mass, as well as quality indicators of effervescent tablets were determined according to the methods described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition.

**Results and discussion.** Numerical indicators of dry fruits of Aronia melanocarpa (crushing of raw materials and the content of foreign impurities, total ash in plant raw materials and ash insoluble in hydrochloric acid, content of extractives) were determined, and the good quality of the raw materials used in the subsequent stages of drug development was confirmed. An extract enriched with anthocyanins has been developed. The composition and technology of effervescent tablets with separate granulation of acidic and basic components has been developed. Extract and ethyl alcohol 96 % were used as moisturizers, and aspartame was used to improve taste characteristics. A draft specification for the quality indicators of effervescent tablets based on enriched extraction has been proposed.

**Conclusion.** In the course of the research work, the numerical indicators of medicinal plant raw materials were determined and its quality was confirmed, which enabled its use for further extraction. Extraction conditions were chosen, extracts were obtained. Excipients have been selected, the composition and technology of effervescent tablets based on the extracts of Aronia melanocarpa fruits have been developed, a draft specification for effervescent tablets has been proposed in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition.

**Keywords:** rectal suppositories, silicone, molding, 3D printing, additive manufacturing, personalized medicine

**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, Tatyana S. Shebitchenko carried out the formulation of the problem. Natalya V. Sokrasnkina performed the experiment, processing the data obtained. Alexandra A. Shmarova, Nadezhda S. Pivovarova, Olesya N. Abrosimova, Ekaterina K. Novikova, Kirill O. Sidorov 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:** Pivovarova N. S., Abrosimova O. N., Shebitchenko T. S., Sokrasnkina N. V., Shmarova A. A., Novikova E. K., Sidorov K. O. Development of composition and technology of effervescent tablets with biologically active complex of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) fruits. *Drug development & registration*. 2022;11(4):125–133. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-125-133>

## ВВЕДЕНИЕ

В современной фармацевтической промышленности с каждым годом повышается интерес к производству лекарственных средств на основе растительного сырья. Это объясняется, в первую очередь,

широким спектром фармакологической активности фитопрепаратов, а также внедрением «экокультуры» – ориентацией рынка сбыта на применение натуральных компонентов. Согласно данным Государственного Реестра лекарственных средств Российской Федерации (РФ) по состоянию на 2021 год доля ле-

карственных средств (ЛС) растительного происхождения составляет примерно 31,5 %. По сравнению с показателями 2017 года, когда указанная доля занимала на рынке примерно 25 %, можно говорить о тенденции роста числа фитопрепаратов в России. Будучи источником ценных биологически активных веществ (БАВ), растения представляют огромный интерес с точки зрения научных разработок. Входящие в состав биообъектов метаболиты обусловливают комплекс фармакологических свойств, например, регенеративных, антисептических и противовоспалительных, достаточно востребованных при создании эффективных лекарственных препаратов. Перспективность разработок фитосредств не вызывает сомнений, так как представляют большой интерес из-за их различной биологической и функциональной активности [1–4].

Арония черноплодная (рябина черноплодная) на протяжении многих лет являлась объектом изучения ученых для выявления различных лечебных свойств, и в 2015 году ее свежие и сухие плоды представлены в качестве лекарственного растительного сырья в Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) 14 издания.

Благодаря разнообразию комплексов биологически активных веществ, входящих в состав плодов аронии черноплодной, она применяется в различных сферах деятельности [5, 6]. Извлечения активно используются в качестве натуральных красителей.

Помимо всего перечисленного, немаловажная роль отведена аронии и в фармацевтической промышленности. Особое внимание уделяется флавонOIDам, дубильным веществам и органическим кислотам. Содержание гликозидов кверцетина и антоциана обеспечивает антиоксидантную, противовоспалительную, гемостатическую и гипотензивную активность препаратов на основе плодов аронии черноплодной. За счет содержания органических кислот, дубильных веществ и пектинов оказывается желчегонный эффект, усиливается обмен веществ, устраняются спазмы, стимулируется выделение пищеварительных соков и нормализуется функционирование пищеварительного тракта [7–11]. Высокое содержание витаминоподобного соединения холина (витамин В4), который входит в состав фосфолипидов и лецитина, способствует усвоению жирных кислот, препятствует отложению жира в печени, стимулирует процессы роста и кроветворения, а также повышает устойчивость организма к возбудителям инфекционных заболеваний. Каротиноиды предотвращают дисфункцию утилизации кислорода в клетках из-за которой, в свою очередь, наступает дефицит кислорода, и способствуют накоплению в организме кислорода [10, 12].

Фармакологическое действие плодов аронии черноплодной основано на биологически активных веществах, содержащихся в ее составе (таблице 1).

**Таблица 1. Биологически активные вещества, содержащиеся в аронии черноплодной [10, 12–14]**

**Table 1. Biologically active substances contained in Aronia melanocarpa [10, 12–14]**

Наименование Name	Содержание Content
Углеводы Carbohydrates	10 %
Органические кислоты Organic acids	1,3 %
Пектиновые вещества Pectin substances	0,75 %
Дубильные вещества Tannins	0,6 %
Аскорбиновая кислота (витамин С) Ascorbic acid (vitamin C)	15 мг/%
Цитрин (витамин Р) Citrine (Vitamin P)	2000 мг/%
Каротин Carotene	2,0 мг/%
Рибофлавин Riboflavin	0,13 мг/%
Фолиевая кислота Folic acid	0,1 мг/%
Никотиновая кислота (витамин PP) Nicotinic acid (vitamin PP)	0,5 мг/%
Витамин Е, токоферолы Vitamin E, tocopherols	1,5 мг/%
Филлохинон Phylloquinone	0,8 мг/%
Пиридоксин Pyridoxine	0,06 мг/%
Ниацин Niacin	0,3 мг/%
Тиамин Thiamine	0,01 мг/%

Плоды аронии черноплодной содержат в своем составе также амигдалин, кумарины, рутин, кверцетин, кверцитрин, гесперидин, катехины, цианидин и его гликозиды, сорбит и другие соединения. Из макро- и микроэлементов в большом количестве содержатся железо, марганец, йод, а также соли молибдена, бора, марганца, меди [10, 12–14].

Перспективной лекарственной формой, содержащей комплекс биологически активных веществ, являются шипучие таблетки, обладающие следующими преимуществами: быстрое высвобождение активных ингредиентов, высокая скорость усвоения БАВ, удобство применения и приятный вкус.

Среди особенностей технологии шипучих таблеток, возникающих из-за их специфических физико-химических свойств, следует выделить наличие большого количества различных групп вспомогательных веществ; гигроскопичность компонентов и готового продукта, а также его габариты – масса таблеток варьируется от 2 до 5 грамм, а диаметр от 20 до 25 миллиметров. Для получения шипучих таблеток используются четыре различные технологии таблетирования: прямое прессование; сухая грануляция; грануляция с увлажнением этиловым спиртом высокой концент-

рации (80–96 %); раздельная грануляция кислотных и основных компонентов [15–17].

**Цель исследования** – разработка состава и технологии шипучих таблеток с биологически активным комплексом из аронии черноплодной сухих плодов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Объектом исследования служили аронии черноплодной плоды, собранные в 2021 году в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (пос. Лемболово, Ленинградская область), высушенные в сушильном шкафу с принудительной конвекцией OF-12G (JeioTech, Южная Корея) при температуре 40 °C, винная кислота (CAS № 147-71-7, АО «ВЕКТОН», Россия), натрий углекислый кислый (CAS № 144-55-8, АО «ВЕКТОН», Россия), аспартам (CAS № 22839-47-0, ООО «Альфа-Вета.ком», Россия), полиэтиленгликоль 6000 (CAS № 79-09-4, ООО ОРТ «Химреактивы», Россия), этиловый спирт 96 % (№ ФС-001856, ООО «РОСБИО», Россия), лактоза моногидрат (CAS № 10039-26-6, Meelunie B.V., Нидерланды), повидон (Plasdone™ K-29/32) (CAS № 9003-39-8, Ashland Inc., США).

### Методы и оборудование

#### Товароведческий анализ лекарственного растительного сырья (ЛРС)

Предварительно аронии черноплодной сухие плоды измельчали на мельнице роторной ножевой РМ 120M (ООО «ВИБРОТЕХНИК», Россия) до размера частиц 0,5–1,0 мм.

Измельченность сырья и содержание посторонних примесей [электромагнитный ситовой шейкер RP 200N (CISA, Испания)], общая зола в ЛРС [электропечь лабораторная муфельная LOIP LF-7/13-G1 (LOIP, Россия)], остаточная влажность (влагомер термогравиметрический инфракрасный MA-150 [Sartorius AG, Германия]), содержание экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье (ЛРС) – определяли по методикам, описанным в ГФ XIV [18].

#### Получение извлечения из аронии черноплодной плодов в лабораторных условиях

При выборе метода получения извлечения определяющими факторами являются технологические свойства сырья, способ экстрагирования и физико-химические параметры проведения процесса.

Опираясь на труды Н. Б. Еремеевой и Н. В. Макаровой «О влиянии технологии экстракции на антиоксидантную активность экстрактов плодов черноплодной рябины» [19] подобраны оптимальные параметры получения извлечения.

В качестве экстрагента использовали этиловый спирт 70 %, а также этиловый спирт 70 % подкисленный 0,1 н хлористоводородной кислотой pH = 3,0 [рН-метр лабораторный РВ-11-Р11 (Sartorius AG, Германия)]. Навеску сухих измельченных плодов аронии черноплодной помещают в колбу 100 мл с притертой пробкой и добавляют необходимое количество экстрагента (гидромодуль – 1:10), далее оставляли настаиваться в течение часа. Экстракцию проводили в ванне ультразвуковой 2,8 л «Сапфир» (АО «НПП «Сапфир», Россия) при рабочей частоте 35 кГц, температуре  $37 \pm 1$  °C в течение 20 минут. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры, а затем фильтровали через бумажный фильтр, после чего извлечение концентрировали до соотношения сырье:извлечение (1:5).

В лабораторных условиях наработано по 100 мл извлечения.

#### Количественное определение антоцианов в извлечениях

Содержание антоцианов, в полученных извлечениях, контролировали спектрофотометрическим анализом. Анализ проводили на СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия), в ходе которого определяли количественное содержание антоцианов в извлечениях в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид (длина волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм). В качестве раствора сравнения использован соответствующий экстрагент.

#### Получение гранулята и шипучих таблеток в лабораторных условиях

Вспомогательные вещества просеивали через сито с размером ячеек 0,5 мм. Компоненты, входящие в состав гранулята 1 (винная кислота, лактоза моногидрат, повидон, полиэтиленгликоль-6000) и гранулята 2 (натрий углекислый кислый, лактоза моногидрат, повидон, полиэтиленгликоль-6000), взвешивали на весах лабораторных СЕ 224-С (ООО «Сартогосм», Россия) с точностью 0,001 г. В лабораторном смесителе объемом 0,5 литра (Robert Bosch GmbH, Германия) предварительно осуществляли смешение компонентов для гранулята 1 и 2 без добавления полиэтиленгликоля-6000. Смесь порошков для гранулята 1 увлажняли извлечением из аронии черноплодной сухих плодов, а для гранулята 2 – этиловым спиртом 96 %. Расход увлажнителя замеряли на весах лабораторных СЕ 224-С. Влажную массу 1 и 2 гранулировали через сито-гранулятор с размером ячеек 2 мм, затем сушили до остаточной влажности 2 % при комнатной температуре. Высушенные грануляты калибровали через сито с размером ячеек 1 мм. Гранулят 1 и 2 смешивали с аспартамом в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» в течение 5 минут. В лабораторных условиях наработано 100,0 г. массы для таблетирования.

Таблетирование осуществляли на лабораторном гидравлическом таблеточном прессе ПГР-10 (ООО «ЛабТулс», Россия) при помощи набора пресс-форм, масса навески 2,8 грамм.

#### Исследование технологических свойств гранулята и массы для таблетирования

Технологические свойства гранулята и массы для таблетирования: фракционный состав – ситовой анализ [электромагнитный ситовой шейкер RP 200N (CISA, Испания)], степень сыпучести и угол естественного откоса [тестер сыпучести GTL (ERWEKA GmbH, Германия)], насыпная плотность [тестер насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA GmbH, Германия)], прессымость [тестер твердости таблеток TBH 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия)] – определяли по методикам, описанным в ГФ РФ XIV [18].

#### Исследование показателей качества шипучих таблеток

Однородность массы [аналитические весы СЕ 224-С (ООО «Сартогосм», Россия)], распадаемость таблеток [тестер распадаемости таблеток ZT 322 m (ERWEKA GmbH, Германия)], pH водного раствора [рН-метр лабораторный PB-11-P11 (Sartorius AG, Германия)], – определяли по методикам, описанным в ГФ РФ XIV [18].

Количественное определение антоцианов проводили методом спектрофотометрии [СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия)].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования были определены числовые показатели (измельченность, содержание посторонних примесей, зола общая и не растворимая в хлористоводородной кислоте, влажность, экстрактивные вещества) выбранного ЛРС, с целью подтверждения доброкачественности. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Результаты, полученные в ходе определения числовых показателей подтверждают доброкачественность сырья согласно требованиям ФС.2.5.0003.15 «Аронии черноплодной сухие плоды», используемого на последующих этапах разработки лекарственного средства.

На втором этапе исследования были получены извлечения и проведена оценка количественного содержания антоцианов. Результаты представлены в таблице 3.

Для дальнейшего исследование использовали извлечение № 2, обогащенное антоцианами.

На третьем этапе проведен выбор вспомогательных веществ с учетом их технологических свойств и выбрано 2 состава (таблица 4).

**Таблица 2. Анализ числовых показателей в ЛРС**

**Table 2. Analysis of numerical indicators in medicinal plant raw materials**

Показатель качества Level of quality	Результаты Results	
Влажность, не более, % Humidity, no more %	3,48	
Зола общая, не более, % Ash total, no more, %	2,22	
Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте, не более % Ash insoluble in hydrochloric acid, no more than %	0,33	
Минеральная примесь, не более, % Mineral impurity, no more, %	0,1	
Органическая примесь, не более, % Organic impurity, no more, %	не обнаружено not found	
Экстрактивные вещества, не менее, % Extractive substances, not less than %		
а) вода очищенна	a) 26,93	
б) спирт этиловый 70 %	b) 46,28	
Extractive substances, not less than %		
а) purified water	a) 26.93	
б) ethyl alcohol 70 %	b) 46.28	
Фракционный состав, % Fractional composition, %	>1 мм >1 mm	0,45 ± 0,02
	1...0,710 мм 1...0.710 mm	23,45 ± 1,17
	0,710...0,500 мм 0.710...0.500 mm	72,15 ± 3,61
	0,500...0,355 мм 0.500...0.355 mm	2,32 ± 0,22
	<0,355 мм <0.355 mm	1,63 ± 0,08

**Таблица 3. Количественное содержание антоцианов, в полученных извлечениях**

**Table 3. The quantitative content of anthocyanins in the obtained extracts**

№ извлечения Extract No.	Экстрагент Extractant	Количественное содержание антоцианов*, % Quantitative content of anthocyanins*, %
1	Этиловый спирт 70 % Ethyl alcohol 70 %	1,01 ± 0,04
2	Этиловый спирт 70 % подкисленный 0,1 н хлористоводородной кислотой Ethyl alcohol 70 % acidified with 0,1 n hydrochloric acid	3,59 ± 0,16

**Примечание.** \* В пересчете на цианидин-3-O-глюкозид.

**Note.** \* In terms of cyanidin-3-O-glucoside.

Изучены технологические свойства гранулята и массы для таблетирования, данные представлены в таблице 5.

Полученные массы для таблетирования обладали хорошими технологическими свойствами, которые позволяли провести таблетирование. Однако, масса для таблетирования, содержащая сорбитол (состав 1), по истечении времени становилась более влажной

**Таблица 4. Составы шипучих таблеток**

**Table 4. Compositions of effervescent tablets**

Состав Composition	Компоненты Components		
	Наименование Name	Содержание на 100,0 г Content per 100.0 g	Состав на 1 таблетку, г Composition per 1 tablet, g
Состав № 1 Composition № 1	Винная кислота Wine acid	40,0	1,120
	Сорбитол Sorbitol	20,0	0,560
	Обогащенное извлечение из аронии черноплодной сухих плодов Enriched extract from Aronia melanocarpa	4,8 мл (0,690 пересчет на антоцианы) 4,8 ml (0,690 converted to anthocyanins)	0,027 мл (0,021 пересчет на антоцианы) 0,027 ml (0,021 converted to anthocyanins)
	Натрий углекислый кислый Sodium carbonate acid	34,0	0,952
	Полиэтиленгликоль-6000 Polyethylene glycol 6000	3,5	0,098
	Аспартам Aspartame	1,62	0,045
	Этиловый спирт 96 % Ethyl alcohol 96 %	q.s.	-
	<b>Итого: Total:</b>	<b>100,0 г</b>	<b>2,8 г</b>
Состав № 2 Composition № 2	Винная кислота Wine acid	40,0	1,120
	Лактоза моногидрат Lactose monohydrate	20,0	0,560
	Повидон Povidone	4,0	0,112
	Обогащенное извлечение из аронии черноплодной сухих плодов Enriched extract from Aronia melanocarpa	6,3 мл (0,9862 пересчет на антоцианы) 6,3 ml (0,9862 converted to anthocyanins)	0,035мл (0,028 пересчет на антоцианы) 0,035 ml (0,028 converted to anthocyanins)
	Натрий углекислый кислый Sodium carbonate acid	29,0	0,812
	Полиэтиленгликоль-6000 Polyethylene glycol 6000	4,5	0,126
	Аспартам Aspartame	1,24	0,035
	Этиловый спирт 96 % Ethyl alcohol 96 %	q.s.	q.s.
<b>Итого: Total:</b>		<b>100,0 г</b>	<b>2,8 г</b>

и начинала прилипать к пресс-форме. Это связано с гигроскопичными свойствами сорбита. Поэтому в итоговом варианте состава в качестве разбавителя выбрана лактоза (состав 2).

На следующем этапе изучено влияние давления прессования на показатели качества готового продукта, а именно на распадаемость и прочность таблеток на раздавливание. На рисунке 1 представлена зависимость этих показателей от давления, при котором осуществлялось прессование.

Установлено, что при увеличении давления прессования в диапазоне 1,2–2,04 тонн/см<sup>2</sup> время распадаемости таблеток увеличивается до 4 минут, при этом прочность на раздавливание увеличивается фактически в два раза, а при достижении 2,8 тонн/см<sup>2</sup> время распадаемости сокращается до 3,43 мин.

Для сохранения потребительских качеств полученного продукта достаточно использовать давление прессования 1,2 тонн/см<sup>2</sup>, при котором время распадаемости составляет 3,5 минуты, а прочность на раздавливание 75,5 Н.

Проведен испытания шипучих таблеток по показателям качества в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, проект спецификации основных показателей качества представлен в таблице 6.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследовательской работы определены числовые показатели аронии черноплодной сухих плодов и подтверждено их качество, что позволило использовать для дальнейшего получения извлечений. Выбраны условия экстрагирования, получены

Таблица 5. Технологические свойства гранулята и массы для таблетирования

Table 5. Technological properties of granulate and tableting mass

Объект An object	Показатель Index			
	Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup> Bulk weight before compaction, g/cm <sup>3</sup>	Сыпучесть, с/100г Looseness, s/100g	Средний диаметр частиц, мм Average particle diameter, mm	Угол естественного откоса, ° Angle of repose, °
Состав 1 Composition 1	Гранулят 1 Granulate 1	0,08 ± 0,01	2,5 ± 0,6	0,84 ± 0,18
	Гранулят 2 Granulate 2	0,06 ± 0,01	2,4 ± 0,5	0,67 ± 0,15
	Масса для таблетирования Weight for tableting	0,05 ± 0,01	2,1 ± 0,4	0,76 ± 0,16
Состав 2 Composition 2	Гранулят 1 Granulate 1	0,12 ± 0,02	4,2 ± 0,7	0,48 ± 0,14
	Гранулят 2 Granulate 2	0,08 ± 0,01	1,3 ± 0,3	0,40 ± 0,14
	Масса для таблетирования Weight for tableting	0,06 ± 0,01	2,6 ± 0,4	0,43 ± 0,13

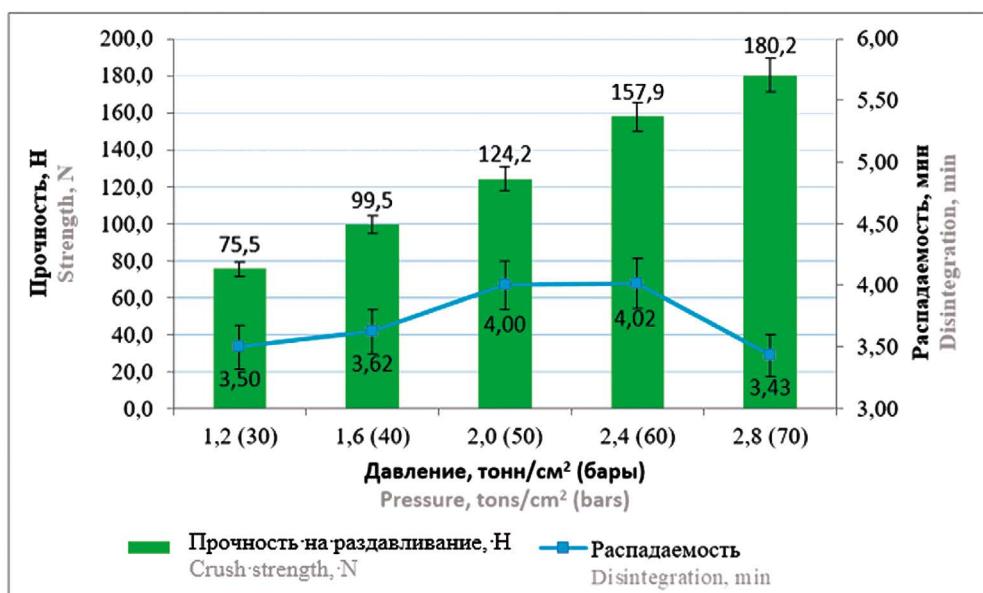


Рисунок 1. Влияние давления прессования на показатели качества готового продукта

Figure 1. Influence of pressing pressure on the quality indicators of the finished product

извлечения. Подобраны вспомогательные вещества, разработан состав и технология шипучих таблеток на основе извлечения из аронии черноплодной сухих плодов, предложен проект спецификации на шипучие таблетки в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бочарова О. А., Карпова Р. В., Бочаров Е. В., Вершинская А. А., Барышникова М. А., Казеев И. В., Кучеряну В. Г., Киселевский М. В., Матвеев В. Б. Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитокомпозиций. *Российский биотерапевтический журнал*. 2020;19(4):35–44.
- Абросимова О. Н., Пивоварова Н. С., Буракова М. А., Шебитченко Т. С. Разработка технологии и состава средства для

полости рта на основе фитосубстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):37–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45.

- Шур Ю. В., Шур В. Ю., Самотруева М. А. Некоторые механизмы иммунотропного и адаптогенного действия фитопрепараты. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019;17(4):19–29. DOI: 10.17816/rctf17419-29.
- 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56.
- Хандогина А. А. Исторический опыт и перспективы изучения и использования сырья аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) в медицине и фармацевтике. В сб.: XII Международной научно-практической конференции «Современная наука: актуальные вопросы, достижения и инновации». Пенза: Наука и Просвещение; 2020. 181–186 с.

**Таблица 6. Проект спецификации показателей качества шипучих таблеток на основе извлечений аронии черноплодной**

**Table 6. Draft specification of quality indicators for effervescent tablets based on Aronia melanocarpa extracts**

Показатель качества Level of quality	Метод анализа Analysis method	Результат испытаний Test result
Описание Description	Органолептический и визуальный Organoleptic and visual	Шипучие плоскоцилиндрические светло-розовые таблетки с белыми вкраплениями, слабым характерным запахом, диаметром 22 мм Effervescent flat-cylindrical light pink tablets with white patches, a slight characteristic odor, 22 mm in diameter
Однородность массы Mass uniformity	Гравиметрический Gravimetric	2,80 ± 0,14
Подлинность Authenticity	Качественная реакция на антоцианы Qualitative response to anthocyanins	Окрашивание раствора в светло-зеленый цвет The color of the solution is light green
Количественное определение Quantitation	Спектрофотометрия Spectrophotometry	Содержание антоцианов не менее 0,030 ± 0,002 % в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид The content of anthocyanins is not less than 0,030 ± 0,002 % in terms of cyanidin-3-O-glucoside
pH водного раствора pH of aqueous solution	Потенциометрический Potentiometric	4,15 ± 0,12
Распадаемость Disintegration	Не более 5 мин No more than 5 minutes	0,5 мин Соответствует Match
Растворение Dissolution	Не проводится, т. к. время распадаемости менее 5 минут Not carried out since disintegration time is less than 5 minutes	
Микробиологическая чистота Microbiological purity	Биологический Biological	Соответствует категории 3Б Complies with category 3B

6. Zhang Y., Zhao Y., Liu X., Chen X., Ding C., Dong L., Zhang J., Sun S., Ding Q., Khatoom S., Cheng Z., Liu W., Shen L., Xiao F. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as a new functional food relationship with health: an overview. *Journal of Future Foods.* 2021;1(2):168–178. DOI: 10.1016/j.jfutfo.2022.01.006.
7. Сафонова И. В., Козлов В. А., Гольдина И. А., Гайдуль К. В. Арония черноплодная: биологическая активность и перспективы использования в медицине. *Инновации и продовольственная безопасность.* 2014;3:32–43.
8. Jahn A., Kim J., Bashir K. M. I., gi Cho, M. Antioxidant Content of Aronia Infused Beer. *Fermentation.* 2020;6(3):71. DOI: 10.3390/fermentation6030071.
9. Jurendić T., Šćetar M. Aronia melanocarpa products and by-products for health and nutrition: A review. *Antioxidants.* 2021;10(7):1052. DOI: 10.3390/antiox10071052.
10. Platonova E. Y., Shaposhnikov M. V., Lee H.-Y., Lee J.-H., Min K.-J., Moskalev A. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts in terms of geroprotector criteria. *Trends in Food Science & Technology.* 2021;114:570–584. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.06.020.
11. Kasprzak-Drozd K., Oniszczuk T., Soja J., Gancarz M., Wojtunik-Kulesza K., Markut-Miotła E., Oniszczuk A. The Efficacy of Black Chokeberry Fruits against Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(12):6541. DOI: 10.3390/ijms22126541.
12. Елисеева Л. Г., Блинникова О. М. Источник витаминно-минеральных комплексов. *Пищевая промышленность.* 2013;4:28–29.
13. Логинова Е. Е., Брежнева Т. А., Самылина И. А., Сливкин А. И. Химический состав плодов аронии различных сортов. *Фармация.* 2015;64(6):22–26.
14. Sidor A., Gramza-Michałowska A. Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* L. – A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules.* 2019;24(20):3710. DOI: 10.3390/molecules24203710.
15. Елагина А. О., Беляцкая А. В., Краснюк И. И. (мл.), Краснюк И. И., Степанова О. И., Фатеева Т. В., Смолярчук Е. А., Козин С. В., Плахотная О. Н., Растворина О. В., Рай Д. В. Разработка состава и технологии шипучих таблеток с твердой дисперсией производного нитрофурана. *Фармация и фармакология.* 2022;10(1):55–68. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-55-68.
16. Листов К. Н., Яковлев Р. А. Разработка состава и технологии шипучих таблеток для профилактики нарушений мозгового кровообращения у лиц пожилого возраста. *Известия Российской Военно-медицинской академии.* 2021;40(2):77–82. DOI: 10.17816/rmmr77854.
17. Prajapati B. G., Mishra O. Concept, Manufacturing and Characterization of Effervescent Tablets: A Review. *Sun Text Review of Pharmaceutical Sciences.* 2021;2(1):110. DOI: 10.51737/2766-5232.2021.010.
18. Государственная фармакопея XIV издания. М.: Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2018.
19. Еремеева Н. Б., Макарова Н. В. Влияние технологии экстракции на антиоксидантную активность экстрактов плодов черноплодной рябины. *Вестник Мурманского государственного технического университета.* 2017;(20)3:600–608.

## REFERENCES

1. Bocharova O. A., Karpova R. V., Bocharov E. V., Vershinskaya A. A., Baryshnikova M. A., Kazeev I. V., Kucheryanu V. G., Kiselevskii M. V., Matveev V. B. Research of phytoadaptogens and the possibility of using phytocompositions. *Russian biotherapeutic journal.* 2020;19(4):35–44. (In Russ.)
2. Abrosimova O. N., Pivovarova N. S., Burakova M. A., Shebichenko T. S. Development of Technology and Composition of the Medicinal Product for Oral Cavity Based on Phytoactive Substances. *Drug development & registration.* 2021;10(4–1):37–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45.

3. Shur Yu. V., Shur V. Yu., Samottrueva M. A. Some mechanisms of immunotropic and adaptogenic action of phytopreparations. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy.* 2019;17(4):19–29. (In Russ.) DOI: 10.17816/rcf17419-29.
4. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56.
5. Khandogina A. A. Historical experience and prospects for the study and use of chokeberry raw materials (aronia melanocarpa (michx.) elliott) in medicine and pharmaceuticals. In: XII International Scientific and Practical Conference "Modern Science: Current Issues, Achievements and Innovations". Penza: Science and Education; 2020. 181–186 p. (In Russ.)
6. Zhang Y., Zhao Y., Liu X., Chen X., Ding C., Dong L., Zhang J., Sun S., Ding Q., Khatoon S., Cheng Z., Liu W., Shen L., Xiao F. Chokeberry (Aronia melanocarpa) as a new functional food relationship with health: an overview. *Journal of Future Foods.* 2021;1(2):168–178. DOI: 10.1016/j.jfutfo.2022.01.006.
7. Safranova I. V., Kozlov V. A., Goldina I. A., Gaidul K. V. Aronia chokeberry: biological activity and prospects for use in medicine. *Innovation and food security.* 2014;3:32–43. (In Russ.)
8. Jahn A., Kim J., Bashir K. M. I., gi Cho, M. Antioxidant Content of Aronia Infused Beer. *Fermentation.* 2020;6(3):71. DOI: 10.3390/fermentation6030071.
9. Jurendić T., Ščetar M. Aronia melanocarpa products and by-products for health and nutrition: A review. *Antioxidants.* 2021;10(7):1052. DOI: 10.3390/antiox10071052.
10. Platonova E. Y., Shaposhnikov M. V., Lee H.-Y., Lee J.-H., Min K.-J., Moskalev A. Black chokeberry (Aronia melanocarpa) extracts in terms of geroprotector criteria. *Trends in Food Science & Technology.* 2021;114:570–584. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.06.020.
11. Kasprzak-Drozd K., Oniszczuk T., Soja J., Gancarz M., Wojtunik-Kulesza K., Markut-Miotła E., Oniszczuk A. The Efficacy of Black Chokeberry Fruits against Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(12):6541. DOI: 10.3390/ijms22126541.
12. Eliseeva L. G., Blinnikova O. M. Source of vitamin-mineral complexes. *Food industry.* 2013;4:28–29. (In Russ.)
13. Logvinova E. E., Brezhneva T. A., Samylina I. A., Slivkin A. I. Chemical composition of aronia fruits of various varieties. *Pharmacy.* 2015;64(6):22–26. (In Russ.)
14. Sidor A., Gramza-Michałowska A. Black Chokeberry Aronia melanocarpa L. – A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules.* 2019;24(20):3710. DOI: 10.3390/molecules24203710.
15. Elagina A. O., Belyatskaya A. V., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Fateeva T. V., Smolyarchuk E. A., Kozin S. V., Plakhonaya O. N., Rastopchina O. V., Rau J. V. Development of nitrofuran derivative: composition and technology of effervescent tablets with solid dispersions. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(1):55–68. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-55-68.
16. Listov K. N., Yakovlev R. A. Development of the composition and technology of effervescent tablets for the prevention of cerebral circulation disorders in the elderly. *Russian Military Medical Academy Reports.* 2021;40(2):77–82. (In Russ.) DOI: 10.17816/rmmr77854.
17. Prajapati B. G., Mishra O. Concept, Manufacturing and Characterization of Effervescent Tablets: A Review. *Sun Text Review of Pharmaceutical Sciences.* 2021;2(1):110. DOI: 10.51737/2766-5232.2021.010.
18. State Pharmacopoeia XIV edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.)
19. Eremeeva N. B., Makarova N. V. Influence of extraction technology on the antioxidant activity of chokeberry fruit extracts. *Bulletin of the Murmansk state technical university.* 2017;(20)3:600–608. (In Russ.)



Оригинальная статья / Research article

## Разработка состава и технологии орально диспергируемых таблеток на основе этилтиобензимидазола фумарата

И. Д. Касымов<sup>✉</sup>, А. В. Басевич, А. Л. Марченко, В. А. Вайнштейн

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Касымов Илья Данилович. E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

ORCID: И. Д. Касымов – <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>; А. В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>;  
А. Л. Марченко – <https://orcid.org/0000-0002-8049-6207>; В. А. Вайнштейн – <https://orcid.org/0000-0003-2304-7605>.

Статья поступила: 06.09.2022      Статья принята в печать: 28.10.2022      Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** В статье представлены результаты разработки состава и технологии орально диспергируемых таблеток (ОДТ) этилтиобензимидазола фумарата (ЭТБИФ) – нового актопротекторного и адаптогенного средства.

**Цель.** Разработка и обоснование состава и технологии орально диспергируемых таблеток на основе этилтиобензимидазола фумарата.

**Материалы и методы.** Изучение технологических свойств образцов таблеток проводили по методикам Государственной Фармакопеи XIV издания с помощью таблетпресса ПГР-10 (ООО «ЛабТулс», Россия), тестера твердости таблеток ТВН 125 ТДР (ERWEKA GmbH, Германия), тестера распадаемости таблеток ZT 322 м (ERWEKA GmbH, Германия), тестера истираемости TAR 220 (ERWEKA GmbH, Германия).

**Результаты и обсуждение.** В результате исследования был разработан и обоснован состав орально диспергируемых таблеток на основе новой субстанции – этилтиобензимидазола фумарата. В качестве обоснования приводятся данные анализа технологических свойств субстанции и вспомогательных веществ, результаты многофакторного эксперимента, спланированного с использованием программы Minitab 17, а также данные о прочностных характеристиках полученных таблеток и зависимости времени распадаемости таблеток и их прочностных характеристик от давления прессования.

**Заключение.** На основании результатов исследования предложен оптимальный состав орально диспергируемых таблеток на основе этилтиобензимидазола фумарата.

**Ключевые слова:** орально диспергируемые таблетки, этилтиобензимидазола фумарат, разработка состава, модифицированное высвобождение

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

**Вклад авторов.** И. Д. Касымов осуществил проведение экспериментов. И. Д. Касымов, А. В. Басевич осуществили обработку полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написание 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:** Касымов И. Д., Басевич А. В., Марченко А. Л., Вайнштейн В. А. Разработка состава и технологии орально диспергируемых таблеток на основе этилтиобензимидазола фумарата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):134–140. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-134-140>

## Development of the Composition and Technology of Orally Dispersed Tablets Based on Ethylthiobenzimidazole Fumarate

Ilya D. Kasymov<sup>✉</sup>, Anna V. Basevich, Alexei L. Marchenko, Victor A. Vainshtein

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Ilya D. Kasymov. E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

ORCID: Ilya D. Kasymov – <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>; Anna V. Basevich – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>;  
Alexei L. Marchenko – <https://orcid.org/0000-0002-8049-6207>; V. A. Vainshtein – <https://orcid.org/0000-0003-2304-7605>.

Received: 06.09.2022      Revised: 28.10.2022      Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** The article presents the results of the development of the composition and technology of orally dispersed tablets of ethylthiobenzimidazole fumarate – a new actoprotective and adaptogenic agent.

**Aim.** Development and substantiation of the composition and technology of orally dispersed tablets based on ethylthiobenzimidazole fumarate.

**Materials and methods.** The technological properties of tablet samples were studied according to the methods of the State Pharmacopoeia of the XIV edition using the PGR-10 tablet press (LLC "LabTools", Russia), TBH 125 TDP tablet hardness tester (ERWEKA GmbH, Germany), ZT 322 m tablet disintegration tester (ERWEKA GmbH, Germany), TAR 220 abrasion tester (ERWEKA GmbH, Germany).

© Касымов И. Д., Басевич А. В., Марченко А. Л., Вайнштейн В. А., 2022  
© Kasymov I. D., Basevich A. V., Marchenko A. L., Vainshtein V. A., 2022

**Results and discussion.** As a result of the study, the composition of orally dispersed tablets based on a new substance – ethylthiobenzimidazole fumarate was developed and justified. As a justification, the data of the analysis of the technological properties of the substance and excipients, the results of a multifactorial experiment planned using the Minitab 17 program, as well as data on the strength characteristics of the tablets obtained and the dependence of the disintegration time of the tablets and their strength characteristics on the pressing pressure are given.

**Conclusion.** Based on the results of the study, the optimal composition of orally dispersed tablets based on ethylthiobenzimidazole fumarate is proposed.

**Keywords:** orally dispersed tablets; ethylthiobenzimidazole fumarate; formulation development; modified release

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

**Contribution of the authors.** Ilya D. Kasymov carried out the experiments. Ilya D. Kasymov, Anna V. Basevich processed the received data. All the authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

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

**For citation:** Kasymov I. D., Basevich A. V., Marchenko A. L., Vainshtein V. A. Development of the composition and technology of orally dispersed tablets based on ethylthiobenzimidazole fumarate. *Drug development & registration.* 2022;11(4):134–140. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-134-140>

## ВВЕДЕНИЕ

Орально диспергируемые таблетки – это таблетки, распадающиеся в течение нескольких секунд после помещения их в ротовую полость. Это инновационная лекарственная форма, обладающая достоинствами классических таблеток, такими как удобство приема и повышенная комплаентность, и лишенная их недостатков, таких как трудности при проглатывании.

Для производства орально диспергируемых таблеток применяются такие подходы как лиофилизация, гранулирование массы для таблетирования и прямое прессование [1–4]. Получение таблеток методом прямого прессования – это наиболее простой и экономичный метод [5], при его реализации требуется наименьшее количество технологических операций за счет исключения стадии грануляции. Сокращаются затраты на оборудование, электроэнергию, производственную площадь. Ограничивающий фактор использования прямого прессования заключается в том, что ему, как правило, поддаются только крупнодисперсные порошки с хорошей сыпучестью.

**Целью данной работы** является разработка и обоснование состава и технологии орально диспергируемых таблеток на основе этилтиобензимидазола фумарата. Для обоснования состава и оценки влияния вспомогательных веществ на характеристики готовой лекарственной формы был проведен многофакторный эксперимент.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение технологических свойств таблеток проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIV издания по следующим показателям:

- Описание проводилось в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки».
- Прессуемость вспомогательных веществ проверяли с использованием таблетпресса ПГР-10 (ООО «ЛабТулс», Россия) путем прессования из них модельных таблеток с одинаковой массой при одинаковом давлении прессования. Полученные таблетки оценивались визуально и на прочность на раздавливание с применением тестера твердости таблеток ТВН 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия).
- Анализ распадаемости орально диспергируемых таблеток проводился в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» с использованием прибора ZT 322 m (ERWEKA GmbH, Германия).
- Прочность таблеток на раздавливание оценивалась в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» с применением тестера твердости таблеток ТВН 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия).
- Прочность таблеток на истираемость оценивалась по методике ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток», с применением тестера истираемости таблеток TAR (ERWEKA GmbH, Германия) с 12-ти лопастным барабаном.
- Создание матрицы многофакторного эксперимента и статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводили с помощью программного обеспечения Minitab 17 [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании результатов анализа технологических свойств вспомогательных веществ [7] в состав ОДТ ЭТБИФ были введены следующие вещества: ман-

нитол – в качестве наполнителя; кроскармеллоза и кросповидон – для увеличения скорости распадаемости таблеток; натрия стеарил фумарат – для обеспечения антифрикционных свойств.

Для оптимизации количеств введения вспомогательных веществ и оценки влияния количеств ВВ на скорость распадаемости и прочность таблеток был спланирован многофакторный эксперимент и наработаны модельные составы таблеток. Для проведения эксперимента были выбраны следующие параметры: Массу таблетки для модельных составов было решено принять равной  $200 \pm 0,15$  мг, диаметр пресс-инструмента – 9 мм. При таких параметрах таблетка имеет оптимальную площадь поверхности и хороший товарный вид. Давление прессования модельных составов составило  $P = 37 \pm 2$  бар и было подобрано предварительно на основании свойств прессуемости наполнителя (маннитола). Получение таблеток проводили методом прямого прессования. Получение массы для таблетирования осуществляли путем сухого смешения необходимых количеств компонентов.

Схема эксперимента – двухуровневый полный факторный эксперимент с центральной точкой, независимыми переменными были выбраны: содержание кросповидона (X1), содержание кроскармеллозы натрия (X2), содержание натрия стеарилфумарата (X3). Верхний и нижний уровни факторов эксперимента соответствуют верхней и нижней границе рекомендуемых содержаний соответствующих вспомогательных веществ (таблица 1) [8–11]. Содержание субстанции ЭТБИФ в каждом составе составляет 50 мг. Количество наполнителя (маннитола) меняется в зависимости от содержания остальных вспомогательных веществ таким образом, чтобы масса таблетки оставалась равной 200 мг. Зависимыми переменными, соответственно, являются время распадаемости (Y1) и прочность таблеток на раздавливание (Y2).

**Таблица 1. Пределы содержаний вспомогательных веществ в эксперименте**

Table 1. Limits of the contents of excipients in the experiment

Рекомендуемое содержание, % Recommended content, %	Кросповидон (X1) Crospridone (X1)	Кроскармеллоза натрия (X2) Sodium Crosscarmellose (X2)	Натрия стеарил фумарат (X3) Sodium Stearyl Fumarate (X3)
	2–5	5–15	0,25–4

Создание матрицы и обработка данных производилась с помощью программного обеспечения Minitab 17 [6]. По итогам планирования эксперимента была составлена матрица модельных составов, представленная в таблице 2.

Каждый состав оценивался по показателям распадаемости и прочности таблеток на раздавливание, полученные результаты представлены в таблице 3:

**Таблица 2. Матрица составов с указанием масс компонентов, мг**

Table 2. Matrix of compositions with indication of component weights, mg

№ состава № of composition	ЭТБИФ ETBIF	Маннитол Mannitol	Кросповидон (X1) Crospridone (X1)	Кроскармеллоза натрия (X2) Sodium Crosscarmellose (X2)	Натрия стеарил фумарат (X3) Sodium Stearyl Fumarate (X3)
1	50,00	106,00	10,00	30,00	4,00
2	50,00	129,50	10,00	10,00	0,50
3	50,00	115,50	4,00	30,00	0,50
4	50,00	109,50	10,00	30,00	0,50
5	50,00	132,00	4,00	10,00	4,00
6	50,00	126,00	10,00	10,00	4,00
7	50,00	112,00	4,00	30,00	4,00
8	50,00	120,75	7,00	20,00	2,25
9	50,00	135,50	4,00	10,00	0,50

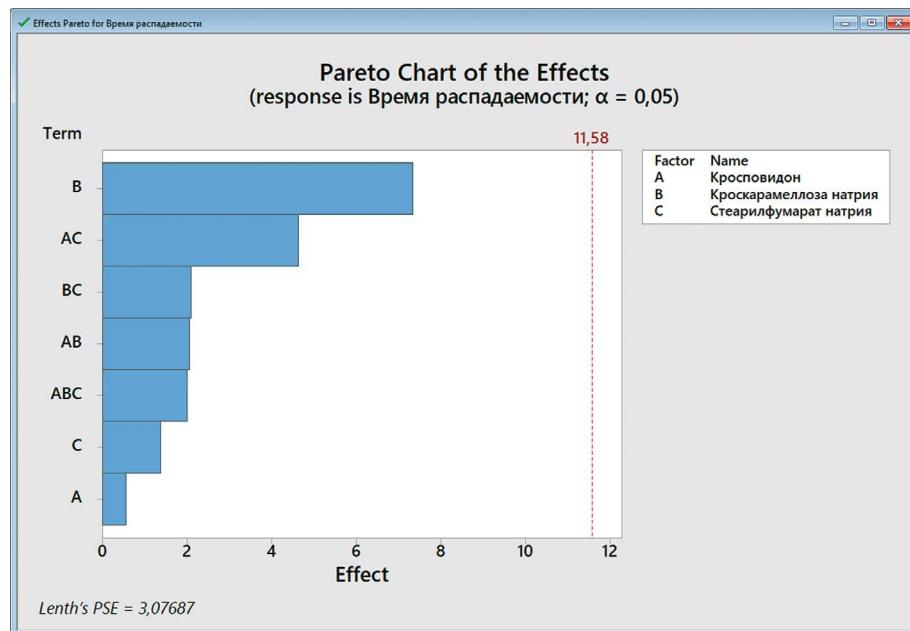
**Таблица 3. Результаты эксперимента (отклики)**

Table 3. Experimental results (responses)

№ состава № of composition	Время распадаемости, с (Y1) Disintegration time, s (Y1)	Прочность на раздавливание, Н (Y2) Crushing strength, N (Y2)
1	$26,44 \pm 0,84$	$64,69 \pm 3,89$
2	$24,41 \pm 2,31$	$78,95 \pm 6,60$
3	$24,47 \pm 1,56$	$88,78 \pm 10,42$
4	$25,60 \pm 2,91$	$74,81 \pm 9,81$
5	$21,07 \pm 2,05$	$79,87 \pm 12,48$
6	$17,05 \pm 0,78$	$85,82 \pm 5,97$
7	$30,55 \pm 1,73$	$71,95 \pm 5,51$
8	$17,43 \pm 1,53$	$83,74 \pm 8,44$
9	$15,17 \pm 0,18$	$88,22 \pm 7,50$

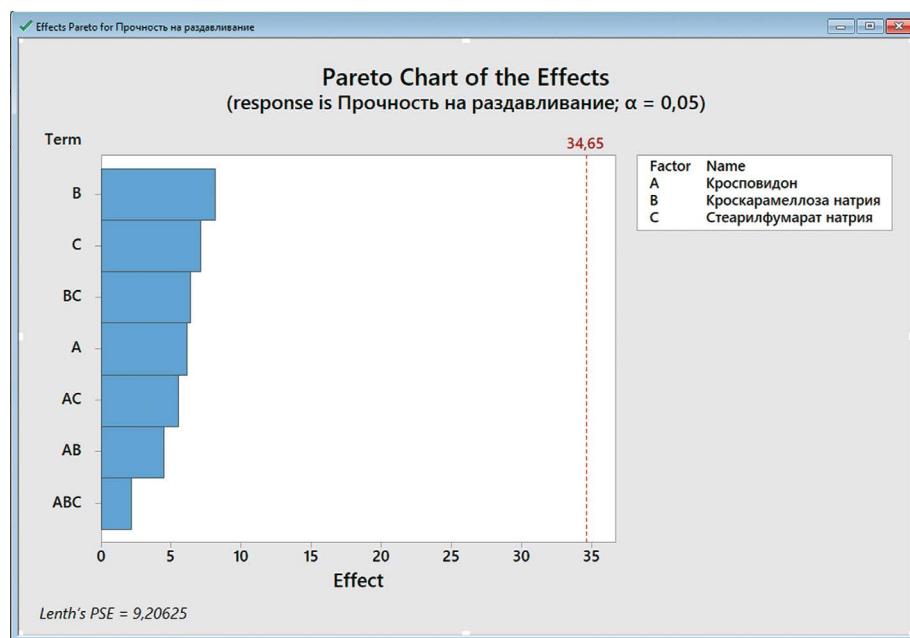
На основании полученных результатов с помощью программного обеспечения Minitab 17 была проведена статистическая обработка результатов. На рисунках 1 и 2 представлены полученные в ходе обработки результатов диаграммы Парето для каждой из зависимых переменных. Эти диаграммы показывают степень влияния каждого их независимых факторов (A, B и C на диаграмме – это факторы X1, X2 и X3 соответственно) эксперимента на зависимые величины – распадаемость таблеток (Y1) и их прочность на раздавливание (Y2).

На диаграммах Парето видно, что ни один из столбцов диаграмм не достигает красной линии, что говорит о том, что ни один из факторов эксперимента не оказывает существенного влияния на зависимые переменные. Таким образом, можно сделать вывод, что в выбранных диапазонах количеств вспо-



**Рисунок 1.** Диаграмма Парето для фактора Y1 (времени распадаемости таблеток)

**Figure 1.** Pareto diagram for factor Y1 (time of disintegration of tablets)



**Рисунок 2.** Диаграмма Парето для фактора Y2 (прочности таблеток на раздавливание)

**Figure 2.** Pareto diagram for factor Y2 (crushing strength of tablets)

могательных веществ между зависимыми переменными (скорость распадаемости и прочность таблеток на раздавливание) и количественным содержанием выбранных вспомогательных веществ в таблетке отсутствуют зависимости. Можно утверждать, что в диапазоне исследования содержания количества вспомогательных веществ не значимы. Однако, следует отметить, что все составы имеют удовлетворительные значения показателей качества: распад-

емость таблеток составляет не более 30 секунд, а значение показателей прочности на раздавливание позволяет характеризовать таблетки как прочные и способные выдержать механическое воздействие при упаковке и транспортировке.

На примере центральной точки (состав № 8) с промежутком в несколько дней было дополнительно изготовлено и проанализировано 2 серии, результаты оценки серий представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Результаты исследования трех серий состава № 8**

**Table 4. Results of the study of three series of composition № 8**

№ состава № of composition	Время распадаемости, с (Y1) Disintegration time, s (Y1)	Прочность на раздавливание, Н (Y2) Crushing strength, N (Y2)
8 (1 серия) 8 (1 episode)	17,43 ± 1,53	83,74 ± 8,44
8 (2 серия) 8 (2 episode)	17,62 ± 1,82	68,68 ± 10,80
8 (3 серия) 8 (3 episode)	18,57 ± 1,06	65,37 ± 7,42

В соответствии с результатами, представленными в таблице 4, можно сделать вывод, что результаты времени распадаемости можно считать воспроизведимыми и удовлетворительными, а значения показателя прочности на раздавливание у разных серий различаются не значительно.

Таким образом, для дальнейшей работы было решено выбрать состав № 8 как обладающий удовлетворительными характеристиками распадаемости и прочности на раздавливание.

**Изучение влияния давления прессования на распадаемость и прочность ОДТ ЭТБИФ.** Давление прессования, как правило, влияет на характеристики таблеток следующим образом: при повышении давления прессования увеличиваются механическая прочность таблеток и время их распадаемости. С целью оценки влияния давления прессования на свойства таблеток ЭТБИФ и выбора оптимального давления был проведен следующий эксперимент. Таблетки массой 200 мг выбранного ранее состава № 8 прессовали при разных давлениях (20, 40 и 60 бар) в матрице диаметром 9 мм. Полученные таблетки оценивали по прочности на раздавливание и времени распадаемости. Результаты исследования в виде диаграмм представлены на рисунках 3 и 4.

Данные, представленные на рисунках 3 и 4, подтверждают, что с увеличением давления прессования возрастает время распадаемости и прочность таблеток. В соответствии с полученными результатами оптимальным давлением прессования было принято значение в 40 бар.

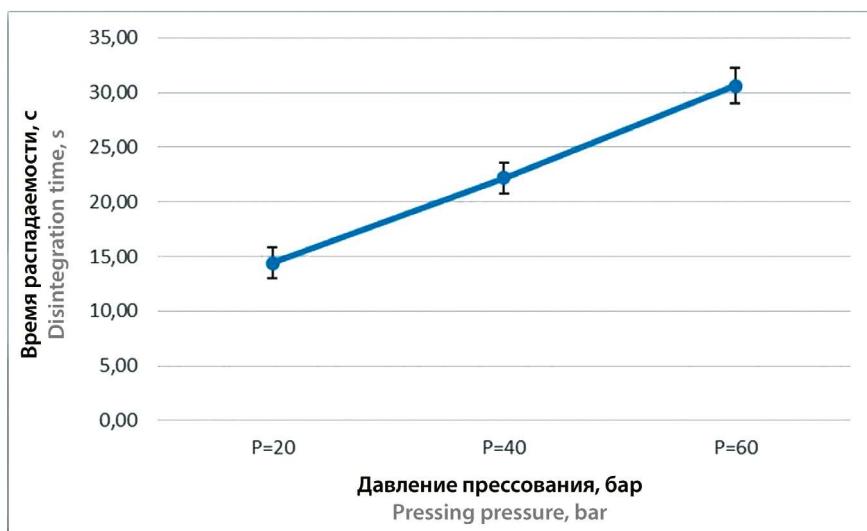
Прочность таблеток на истираемость является дополнительным методом оценки механической прочности готовой лекарственной формы. Для более полной оценки прочности таблеток с помощью барабана на 12 лопастей был проведен тест прочности на истираемость состава № 8, изготовленного при давлении прессования 40 бар. В результате испытания значение потери в массе составило  $0,509 \pm 0,09\%$  (при критерии приемлемости не более 3 %), таким образом, состав № 8 выдерживает требования испытания на истираемость. Таблетки не имели явно выраженных сколов, трещин, отслоений, и в целом сохранили свой товарный внешний вид после испытания.

В результате проведенных исследований по разработке состава и технологии ОДТ ЭТБИФ для производства методом прямого прессования может быть рекомендован следующий состав (таблица 5).

Таким образом, на основании литературных данных и проведенного исследования был разработан состав орально диспергируемых таблеток этилтиобензимидазола фумарата для производства методом прямого прессования.

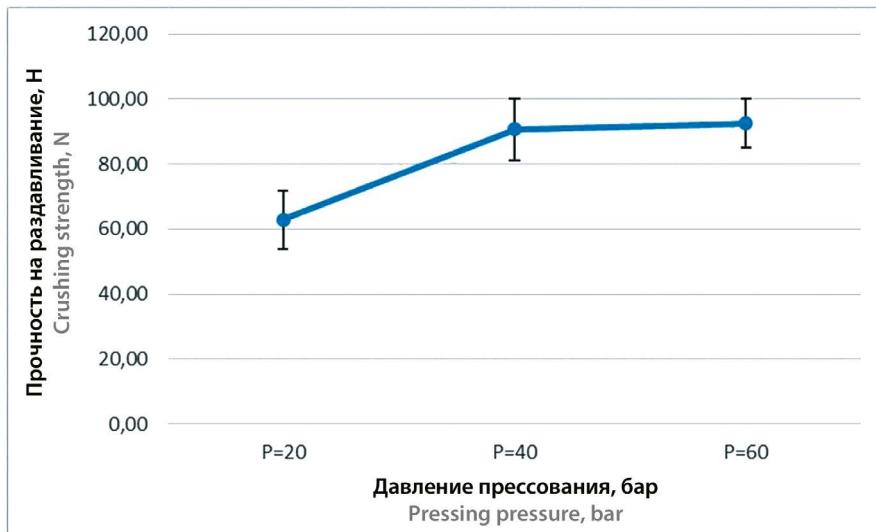
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения исследования был разработан оптимальный состав лекарственного препарата на основе этилтиобензимидазола фумарата, на основании анализа технологических свойств субстанции, вспомогательных веществ, а также данных многофакторного эксперимента обосновано ка-



**Рисунок 3. Зависимость времени распадаемости модельных таблеток от давления прессования**

**Figure 3. Dependence of the decay time of model tablets on the pressing pressure**



**Рисунок 4. Зависимость прочности модельных таблеток от давления прессования**

**Figure 4. Dependence of the strength of model tablets on the pressing pressure**

чество и количественное содержание каждого компонента.

Подобраны оптимальные технологические параметры изготовления таблеток. Изучено влияние давления прессования на время распадаемости и механическую прочность таблеток, и на основании полученных результатов выбрана величина давления прессования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Arvapalli S., Swamy D. Oral disintegration tablets – an updated review. *Indo american journal of pharmaceutical sciences*. 2019;06(03):6929–6934. DOI: 10.5281/zenodo.2617331.
- Şenel S., Comoglu T. Orally disintegrating tablets, fast-dissolving, buccal and sublingual formulations. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2018;23(5):431. DOI: 10.1080/10837450.2018.1462471.
- Comoglu T., Dilek Ozyilmaz E. Orally disintegrating tablets and orally disintegrating mini tablets – novel dosage forms for pediatric use. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24(7):902–914. DOI: 10.1080/10837450.2019.1615090.
- Yu J., Shan X., Chen S., Sun X., Song P., Zhao R., Hu L. Preparation and evaluation of novel multi-channel orally disintegrating tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;142:105108. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105108.
- Lin Z., Xuan J. Cost-effectiveness of aripiprazole orally disintegrating tablets in the treatment of schizophrenia in China. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*. 2020;20(5):549–557. DOI: 10.1080/14737167.2020.1807331.
- Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):45–48. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.

**Таблица 5. Состав орально диспергируемых таблеток ЭТБИФ**

**Table 5. Composition of orally dispersed ETBIF tablets**

Компонент Component	Назначение Appointment	Содержание в одной таблетке, мг Content in one tablet, mg
Этилтиобензимидазола фумарат Ethylthiobenzimidazole Fumarate	Активная фармацевтическая субстанция Active pharmaceutical substance	50
Маннитол Mannitol	Наполнитель. Обеспечивает прессуемость массы для таблетирования, товарный вид таблетки и её сладкий вкус Filler. Provides the compressibility of the mass for tableting, the presentation of the tablet and its sweet taste	120,75
Кросповидон Crosppovidon	Дезинтегранты Disintegrants	7,00
Кроскармеллоза натрия Sodium Croscarmellose		20,00
Натрия стеарил фумарат Sodium Stearyl fumarate	Антифрикционный компонент. Облегчает выталкивание таблеток из матрицы в процессе прессования Antifriction component. Facilitates the ejection of tablets from the matrix during the pressing process	2,25
Итоговая масса таблетки The final weight of the tablet		200

7. Касымов И.Д., Басевич А.В. Изучение технологических свойств вспомогательных веществ при разработке состава орально диспергируемых таблеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4–1):46–53. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53.
8. Смехова И. Е., Вайнштейн В. А., Ладутько Ю. М., Дружининская О. В., Турецкова Н. Н. Дезинтегранты и их влияние на растворение субстанций разных классов по биофармацевтической классификационной системе. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018;(4):62–72.
9. Van der Merwe J., Steenekamp J., Steyn D., Hamman J. The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics.* 2020;12(5):393. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050393.
10. Mahrous G. M., Ibrahim M. A., Mostafa H. F., Elzayat E. M. Application of a quality-by-design approach for utilizing sodium stearyl fumarate as a taste-masking agent in dextromethorphan hydrobromide orally disintegrating tablets. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2019;24(6):711–719. DOI: 10.1080/10837450.2019.1579228.
11. Bowles B. J., Dziemidowicz K., Lopez F. L., Orlu M., Tuleu C., Edwards A. J., Ernest T. B. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets-Part 1: Manufacturability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(6):2598–2609. DOI: 10.1208/s12249-018-1090-4.
4. Yu J., Shan X., Chen S., Sun X., Song P., Zhao R., Hu L. Preparation and evaluation of novel multi-channel orally disintegrating tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020;142:105108. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105108.
5. Lin Z., Xuan J. Cost-effectiveness of aripiprazole orally disintegrating tablets in the treatment of schizophrenia in China. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research.* 2020;20(5):549–557. DOI: 10.1080/14737167.2020.1807331.
6. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Drug development & registration.* 2019;8(3):45–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
7. Kasymov I. D., Basevich A. V. Study of the technological properties of excipients in the development of the composition of orally dispersible tablets. *Drug development & registration.* 2021;10(4–1):46–53. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53.
8. Smekhova I. E., Vainshtein V. A., Ladutko Y. M., Druzhininskaya O. V., Tureckova N. N. Disintegrants and their influence on the dissolution of substances of biopharmaceutical classification system classes. *Drug development & registration.* 2018;(4):62–72. (In Russ.)
9. Van der Merwe J., Steenekamp J., Steyn D., Hamman J. The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics.* 2020;12(5):393. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050393.
10. Mahrous G. M., Ibrahim M. A., Mostafa H. F., Elzayat E. M. Application of a quality-by-design approach for utilizing sodium stearyl fumarate as a taste-masking agent in dextromethorphan hydrobromide orally disintegrating tablets. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2019;24(6):711–719. DOI: 10.1080/10837450.2019.1579228.
11. Bowles B. J., Dziemidowicz K., Lopez F. L., Orlu M., Tuleu C., Edwards A. J., Ernest T. B. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets-Part 1: Manufacturability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(6):2598–2609. DOI: 10.1208/s12249-018-1090-4.

## REFERENCES

1. Arvapalli S., Swamy D. Oral disintegration tablets – an updated review. *Indo american journal of pharmaceutical sciences.* 2019;06(03):6929–6934. DOI: 10.5281/zenodo.2617331.
2. Şenel S., Comoglu T. Orally disintegrating tablets, fast-dissolving, buccal and sublingual formulations. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2018;23(5):431. DOI: 10.1080/10837450.2018.1462471.
3. Comoglu T., Dilek Ozyilmaz E. Orally disintegrating tablets and orally disintegrating mini tablets – novel dosage forms for pediatric use. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2019;24(7):902–914. DOI: 10.1080/10837450.2019.1615090.
1. Arvapalli S., Swamy D. Oral disintegration tablets – an updated review. *Indo american journal of pharmaceutical sciences.* 2019;06(03):6929–6934. DOI: 10.5281/zenodo.2617331.
2. Şenel S., Comoglu T. Orally disintegrating tablets, fast-dissolving, buccal and sublingual formulations. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2018;23(5):431. DOI: 10.1080/10837450.2018.1462471.
3. Comoglu T., Dilek Ozyilmaz E. Orally disintegrating tablets and orally disintegrating mini tablets – novel dosage forms for pediatric use. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2019;24(7):902–914. DOI: 10.1080/10837450.2019.1615090.
4. Yu J., Shan X., Chen S., Sun X., Song P., Zhao R., Hu L. Preparation and evaluation of novel multi-channel orally disintegrating tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020;142:105108. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105108.
5. Lin Z., Xuan J. Cost-effectiveness of aripiprazole orally disintegrating tablets in the treatment of schizophrenia in China. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research.* 2020;20(5):549–557. DOI: 10.1080/14737167.2020.1807331.
6. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Drug development & registration.* 2019;8(3):45–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
7. Kasymov I. D., Basevich A. V. Study of the technological properties of excipients in the development of the composition of orally dispersible tablets. *Drug development & registration.* 2021;10(4–1):46–53. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53.
8. Smekhova I. E., Vainshtein V. A., Ladutko Y. M., Druzhininskaya O. V., Tureckova N. N. Disintegrants and their influence on the dissolution of substances of biopharmaceutical classification system classes. *Drug development & registration.* 2018;(4):62–72. (In Russ.)
9. Van der Merwe J., Steenekamp J., Steyn D., Hamman J. The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics.* 2020;12(5):393. DOI: 10.3390/pharmaceutics12050393.
10. Mahrous G. M., Ibrahim M. A., Mostafa H. F., Elzayat E. M. Application of a quality-by-design approach for utilizing sodium stearyl fumarate as a taste-masking agent in dextromethorphan hydrobromide orally disintegrating tablets. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2019;24(6):711–719. DOI: 10.1080/10837450.2019.1579228.
11. Bowles B. J., Dziemidowicz K., Lopez F. L., Orlu M., Tuleu C., Edwards A. J., Ernest T. B. Co-Processed Excipients for Dispersible Tablets-Part 1: Manufacturability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(6):2598–2609. DOI: 10.1208/s12249-018-1090-4.

21-я Международная выставка  
лабораторного оборудования  
и химических реагентов

**11–14.04.2023**

Москва, Крокус Экспо



**Забронируйте стенд**  
[analitikaexpo.com](http://analitikaexpo.com)





## **Применение подхода Quality-by-Design для обоснования состава и технологии двухкомпонентных суппозиториев**

**И. Е. Смехова<sup>1</sup>✉, Л. В. Шигарова<sup>1</sup>, П. И. Андреева<sup>1</sup>, Е. В. Флисюк<sup>1</sup>, А. С. Дзюба<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> 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  
<sup>2</sup> АО «Фармпроект», 192236, Россия, г. Санкт-Петербург, Софийская ул., д. 14

✉ Контактное лицо: Смехова Ирина Евгеньевна. E-mail: Irina.Smekhova@pharminnotech.com

**ORCID:** И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>; Л. В. Шигарова – <https://orcid.org/0000-0002-9578-6418>;  
П. И. Андреева – <https://orcid.org/0000-0003-0992-0850>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; А. С. Дзюба – <https://orcid.org/0002-8601-2330>.

**Статья поступила:** 06.09.2022

**Статья принята в печать:** 09.11.2022

**Статья опубликована:** 25.11.2022

### **Резюме**

**Введение.** Одним из современных средств, используемых для лечения вагинальных инфекций, являются суппозитории «Депантол», оказывающие антисептическое, регенерирующее действие за счет комбинации хлоргексидина и декспантенола. Начальным этапом в жизненном цикле любого лекарственного препарата (ЛП) является фармацевтическая разработка, системный подход к которой подразумевает принцип «качество путем разработки» [Quality-by-Design (QbD)], основанный на получении надежных научных данных и управлении рисками для качества. При таком подходе фармацевтическая разработка начинается с предварительного определения значимых факторов создания лекарственного средства (ЛС).

**Цель.** Цель исследования – установление планируемого профиля продукта, критических параметров качества, критических характеристик материалов – первоначальных данных, необходимых для разработки состава и технологии воспроизведенного ЛС в соответствии с методологией QbD.

**Материалы исследования.** Объекты исследования: хлоргексидина биглюконат, декспантенол, ПЭГ-400 и ПЭГ-1500, спецификации производителей, документация по фармацевтической разработке. Методы исследования: контент-анализ; системный анализ; метод FMEA (Failure Modes, Effects and Criticality Analysis) – Анализ видов, последствий и критичности отказов.

**Результаты и обсуждение.** С целью реализации подхода QbD для производства продукта надлежащего качества получены исходные данные для разработки состава и технологии двухкомпонентных суппозиториев. Планируемый профиль продукта (QTPP) составлен с учетом данных для оригинального препарата. На основе составленного QTPP были выделены критические для качества параметры (CQAs). Определение CQAs из параметров QTPP основывалось на силе потенциального вреда для качества продукта. В связи с тем, что разрабатывалась известная лекарственная форма, были выбраны показатели качества, стандартные для суппозиториев на гидрофильной основе. С целью определения параметров компонентов препарата, оказывающих влияние на критические показатели качества, для каждого из действующих веществ, входящих в состав суппозиториев, определили критические характеристики материалов (CMAs). Например, для жидких ингредиентов, в соответствии со спецификацией производителя субстанции, это были pH, вязкость, примеси, подлинность, количественное определение, показатель преломления. Для первоначальной оценки рисков были составлены матрицы оценки рисков влияния критических характеристик материалов компонентов на критические параметры качества. При оценке влияния хлоргексидина биглюконата на критические характеристики конечного продукта внимание уделено всем параметрам из спецификации производителя, т. к. любые отклонения в значениях pH, плотности, наличия родственных веществ и посторонних примесей, количественного содержания и подлинности субстанции могут сигнализировать о химической непригодности компонента. На однородность массы суппозиториев влияют только параметры технологического процесса. Влияние CMAs декспантенола на показатели качества готового продукта в целом аналогично влиянию параметров хлоргексидина биглюконата. Различие во влиянии значения pH и содержания воды на показатель микробиологической чистоты: в отличие от хлоргексидина биглюконата, обладающего антисептическими свойствами, декспантенол более подвержен микробной контаминации. Влияние CMAs основы на показатели подлинности, однородности дозирования и количественного содержания не критично. Тогда как значения pH, количественного содержания и подлинности ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 могут оказывать существенное влияние на профиль высвобождения действующих веществ из готовой ЛФ.

**Заключение.** Получены данные, необходимые для проведения начального этапа фармацевтической разработки воспроизведенного препарата, двухкомпонентных суппозиториев: планируемый профиль продукта, критические параметры качества, критические характеристики материалов. Проведена оценка влияния критических характеристик исходных материалов на критические параметры качества продукта.

**Ключевые слова:** фармацевтическая разработка, планируемый профиль продукта, критические параметры качества, критические характеристики материалов, суппозитории

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

**Вклад авторов.** П. И. Андреева осуществила постановку задачи, выполнение практических опытов, обработку результатов. И. Е. Смехова, Л. В. Шигарова, Е. В. Флисюк, А. С. Дзюба осуществили постановку задачи, обработку результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

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

**Для цитирования:** Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Андреева П. И., Флисюк Е. В., Дзюба А. С. Применение подхода Quality-by-Design для обоснования состава и технологии двухкомпонентных суппозиториев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):142–149. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-142-149>

# Application of Quality-by-Design Approach to Justify the Composition and Technology of Two-component Suppositories

Irina E. Smekhova<sup>1</sup>✉, Larisa V. Shigarova<sup>1</sup>, Polina I. Andreeva<sup>1</sup>, Elena V. Flisyuk<sup>1</sup>, Anatoliy S. Dzyuba<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> JSC "Pharmprojekt", 4, Sofiyskaya str., Saint-Petersburg, 192236, Russia

✉ Corresponding author: Irina E. Smekhova. E-mail: Irina.Smekhova@pharminnotech.com

ORCID: Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>; Larisa V. Shigarova – <https://orcid.org/0000-0002-9578-6418>; Polina I. Andreeva – <https://orcid.org/0000-0003-0992-0850>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Anatoliy S. Dzyuba – <https://orcid.org/0002-8601-2330>.

Received: 06.09.2022

Revised: 09.11.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** One of the modern remedies used to treat vaginal infections are suppositories "Depantol", which have an antiseptic, regenerating effect due to the combination of chlorhexidine and dexamphenol. The initial stage in the life cycle of any medicinal product (MP) is pharmaceutical development, a systematic approach to which implies the principle of Quality-by-Design (QbD), which is based on obtaining reliable scientific data and risk management for quality. With this approach, pharmaceutical development begins with a preliminary determination of significant factors in the creation of a drug.

**Aim.** Aim of study was to design Quality Target Product Profile, Critical Quality Attributes, Critical Material Attributes – the initial data necessary for the development of composition and technology of a generic drug in accordance with the QbD methodology of ICH Guidance Q8 "Pharmaceutical Development".

**Materials and methods.** Objects of study: chlorhexidine bigluconate, dexamphenol, PEG-400 and PEG-1500, pharmaceutical development documents. Methods of study: content analysis, system analysis; FMEA method (Failure Modes, Effects and Criticality Analysis).

**Results and discussion.** In order to implement the QbD for the production of a drug of good quality, initial data for the development of the composition and technology of two-component suppositories were obtained. Quality Target Product Profile (QTPP) was compiled taking into account the data of the original drug was used as reference. Based on the compiled QTPP, Critical Quality Attributes (CQAs) were identified. The determination of CQAs from QTPP parameters was based on the strength of the potential harm to the product. Due to the fact that we developed a well-known dosage form, quality indicators were chosen that are standard for hydrophilic suppositories. In order to determine the parameters of the drug components that affect the Critical Quality Attributes, for each of the active pharmaceutical ingredients (APIs) suppositories contain, the Critical Material Attributes (CMAs) were determined. For example, for liquid ingredients, according to the specification of the substance manufacturer, these are pH, viscosity, impurities, identification, assay, refraction index. For the initial risk assessment, risk assessment matrices of the influence of the Critical Material Attributes of the components on the Critical Quality Attributes were compiled. When evaluating the effect of chlorhexidine bigluconate on the critical characteristics of the final product, attention was paid to all parameters from the manufacturer's specification, since any deviations in pH, density, presence of related substances and extraneous impurities, assay and identification of the substance may signal the chemical unsuitability of the component. The weight uniformity of suppositories is affected only by the parameters of the technological process. The influence of CMAs of dexamphenol on the Critical Quality Attributes of the finished product is generally similar to the influence of the parameters of chlorhexidine bigluconate. The difference in the influence of pH and water content on the microbial limits: unlike chlorhexidine bigluconate, which has antiseptic properties, dexamphenol is more susceptible to microbial contamination. The effect of base CMAs on identification, content uniformity, and assay is not critical. Whereas the pH, assay and identification of PEG-400 and PEG-1500 have a significant impact on the dissolution profile of the active ingredients from the finished dosage form.

**Conclusion.** The data required for the pharmaceutical development of a generic drug, two-component suppositories, was obtained: Quality Target Product Profile, Critical Quality Attributes, Critical Material Parameters. The impact of the critical characteristics of the raw materials on the critical quality attributes of the developed suppositories was assessed.

**Keywords:** pharmaceutical development, quality target product profile, critical quality attributes, critical material parameters, suppositories

**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.** Polina I. Andreeva carried out the formulation of the problem, the implementation of practical experiments, and the processing of the results. Irina E. Smekhova, Larisa V. Shigarova, Elena V. Flisyuk, Anatoliy S. Dzyuba formulated the problem and processed the results. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

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

**For citation:** Smekhova I. E., Shigarova L. V., Andreeva P. I., Flisyuk E. V., Dzyuba A. S. Application of Quality-by-Design approach to justify the composition and technology of two-component suppositories. *Drug development & registration.* 2022;11(4):142–149. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-142-149>

## ВВЕДЕНИЕ

На фармацевтическом рынке России суппозитории составляют 1,5 % от общего количества лекарственных препаратов (ЛП), при этом 38,1 % – доля вагинальных суппозиториев [1]. Для лечения и профи-

лактики различных патологий, в т. ч. вагинальных инфекций, успешно применяются не имеющие аналогов на рынке суппозитории «Депантол», оказывающие антисептическое, регенерирующее действие за счет комбинации хлоргексидина, активного в отношении многих грамположительных и грамотри-

цательных бактерий, и декспантенола, обладающего противовоспалительным действием, стимулирующего процессы регенерации [2–4].

Одним из ключевых этапов в разработке суппозиториев является рациональный выбор основы, обеспечивающей постоянство массы и размера лекарственной формы, ее консистентных свойств, оказывающей влияние на биодоступность лекарственного средства (ЛС) [5]. Выбор гидрофильных основ (сплавов полиэтиленгликолей (ПЭГ) с различными молекулярными массами) для суппозиториев обоснован их со-любилизирующим действием, а также химическим строением действующих веществ.

*Фармацевтическая разработка* – начальный этап в жизненном цикле любого ЛП. В рамках международного совета по гармонизации (ICH) было принято руководство ICH Q8 «Фармацевтическая разработка», помогающее стандартизировать процессы, проводимые при создании ЛП, для указания их в Модуле 3 общего технического документа (ОТД) при регистрации [6].

В настоящее время использование документа ICH Q8 для отечественных предприятий носит рекомендательный характер. Производство ЛП в России осуществляется в соответствии с требованиями Правил надлежащей производственной практики (Правила GMP) ЕАЭС, которые частично гармонизированы с рядом международных документов, помимо Руководства ICH Q8, с такими как ICH Q9 «Управление рисками для качества»<sup>1</sup>, ICH Q10 «Фармацевтическая система качества»<sup>2</sup> и некоторыми другими. Важной составляющей процесса внедрения на предприятия отечественной фармацевтической промышленности руководства ICH Q8 является надлежащее документирование [7–9].

Системный подход к фармацевтической разработке подразумевает принцип «качество путем разработки» [Quality-by-Design (QbD)], который основывается на получении надежных научных данных и управлении рисками для качества. При таком подходе фармацевтическая разработка препарата, как оригинального, так и воспроизведенного, начинается с предварительного определения значимых факторов создания ЛС и включает в себя набор обязательных элементов [6], в частности: планируемый профиль продукта – Quality target product profile (QTTP); критические параметры качества – Critical quality attributes (CQAs); критические характеристики материалов – Critical material attributes (CMAs) и некоторые другие.

<sup>1</sup> ICH Q9 "Quality Risk Management". Available at: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q9%20Guideline.pdf>. Accessed: 25.10.2022.

<sup>2</sup> ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Available at: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q10%20Guideline.pdf>. (Accessed: 25.10.2022)

Применение современного подхода к разработке воспроизведенного ЛП позволит создать качественный, но более дешевый аналог оригинального препарата «Депантол», и расширить рынок антисептических вагинальных суппозиториев.

**Цель исследования** – установление планируемого профиля продукта, критических параметров качества, критических характеристик материалов – первоначальных данных, необходимых для разработки состава и технологии воспроизведенного ЛС в соответствии с методологией QbD.

## МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись хлоргексидина биглюконат (серия 400516, производитель ООО «РОСБИО», соответствует требованиям Р № 002769/01-070410 с изм. 1.); декспантенол (серия TLO'l602025, производитель DSM Nutritional Products Ltd., Нидерланды); ПЭГ-400 (партия 6, производитель ООО «Завод синтанолов», Россия, соответствует требованиям ТУ 2483-007-71150986-2006 с изм. 1); ПЭГ-1500 (партия 11, производитель ООО «Завод синтанолов», Россия, соответствует требованиям ТУ 2483-008-71150986-2006 с изм. 1); спецификации производителей, документация по фармацевтической разработке.

Методы исследования: контент-анализ; системный анализ; метод FMEA (Failure Modes, Effects and Criticality Analysis – анализ видов, последствий и критичности отказов).

Метод контент-анализа использовался для сбора данных, содержащихся в научной литературе и нормативных документах.

Системный анализ служил основой для логического и последовательного подхода к решению поставленных задач исследования.

Метод FMEA использовался для качественной оценки рисков в зависимости от их влияния на качество продукта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жизненный цикл ЛП начинается с фармацевтической разработки, гармонизированный и надлежаще документированный процесс которой позволяет наладить дальнейшее производство ЛП с наименьшими рисками и с наиболее полным мониторингом всех технологических процессов [8–9].

С целью реализации подхода QbD для производства продукта необходимого качества нами были получены данные по элементам разработки. Планируемый профиль продукта (QTTP) или перечень характеристик качества ЛП, которые необходимо поддерживать в рамках определенных диапазонов, был составлен с учетом того, что целью исследования была разработка воспроизведенного препарата, поэтому при выборе показателей качества ориентировались на таковые оригинального продукта (таблица 1).

**Таблица 1. Планируемый профиль продукта для разрабатываемого ЛП**

**Table 1. QTPP for developed drug**

Параметр QTPP QTPP elements	Значение Target	Обоснование Justification
Лекарственная форма Dosage form	Суппозитории вагинальные Vaginal suppositories	Как у оригинального ЛП Same as reference drug
Путь введения Route of administration	Интравагинально Intravaginal	Как у оригинального ЛП Same as reference drug
Дозировка действующих веществ (ДВ): декспантенол + хлоргексидина биглюконата, соответственно Dosage strength: dexpanthenol + chlorhexidine bigluconate, respectively	100 + 16 мг 100 + 16 mg	Как у оригинального ЛП Same as reference drug
Фармакокинетика Pharmacokinetics	Биоэквивалентен оригинальному препарату Bioequivalent to reference drug	Требуются испытания биоэквивалентности Bioequivalence requirement
Срок годности Expiration	2 года 2 years	как у оригинального ЛП. Изменения по результатам испытаний стабильности Same as reference drug. Can be changed after further stability testing
Описание Physical Description	Суппозитории торпедообразной формы белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета. Допускается мраморность и наличие на срезе воздушного стержня и воронкообразного углубления Suppositories of bullet shape, white or white with a grayish or yellowish tint. Marbling and the presence of an air rod and a funnel-shaped recess on the cut are allowed	
Подлинность Identification	Необходимо подтвердить подлинность ДВ качественной реакцией Identification of each API in dosage form is needed to be assured by qualitative test	
Однородность массы Content uniformity	В соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Допустимое отклонение от массы суппозитория составляет $\pm 5\%$ In accordance with general pharmacopoeial monograph "Content uniformity of dosage forms". Content uniformity tolerance is 5 % of suppositories mass	
Однородность дозирования Dosage uniformity	В соответствии с ОФС «Однородность дозирования». Проводится количественное определение содержания ДВ по отдельности в каждой отобранный для испытания единице препарата In accordance with general pharmacopoeial monograph "Dosage uniformity". Quantitative assay of API is needed for each suppository selected for testing	Требуется проведение испытаний. Полученные результаты должны совпадать с результатами оригинального ЛП Quality control is needed. Obtained results must meet the same standards as reference drug
Растворение Dissolution	В соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Среда растворения: раствор фосфатного буфера, температура $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . За 45 мин в среду должно перейти не менее 75 % ДВ In accordance with general pharmacopoeial monograph "Dissolution for solid dosage forms". Dissolution medium: phosphate buffer solution, temperature $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ . Within 45 minutes, the medium should contain at least 75 % of API	
Количественное определение Assay	Необходимо количественно определить содержание ДВ It is necessary to quantify API in dosage form	
Упаковка, маркировка Packaging, labeling	5 суппозиториев в контурной ячейковой упаковке из пленки ПВХ ламинированной ПЭ. 1 или 2 контурные ячейковые упаковки помещают в пачку из картона. Маркировка на пачке включает номер серии, срок годности, наименование ЛП 5 suppositories in a blister pack made of PVC film laminated with PE. 1 or 2 blisters are placed in a cardboard box. The marking on the pack includes the batch number, expiration date, name of the drug	
Микробиологическая чистота Microbial limits	В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота». Категория 2 In accordance with general pharmacopoeial monograph "Microbial purity". Category 2	

Разрабатываемый препарат является воспроизведенным, поэтому большинство параметров его QTPP аналогично таковыми оригинального препарата. В случае появления отклонения от этих показателей, его необходимо будет обосновать, а влияние на эффективность ЛП – изучить. Срок годности суппозиториев изначально установили, как аналогичный оригинальному, однако в ходе дальнейшего жизненного цикла препарата он может быть увеличен посредством дополнительных испытаний.

Далее на основе составленного QTPP нами были выделены критические для качества параметры (CQAs) (таблица 2). Как правило, их устанавливают экспериментально или обосновывают.

CQAs применимо к продукту и к веществам, входящим в состав препарата, тогда как QTPP представляет собой перечень параметров, критичных для потребителя. Определение CQAs из параметров QTPP основывали по степени потенциального вреда для продукта [10–11].

В связи с тем, что нами разрабатывалась известная лекарственная форма, были выбраны показатели качества, стандартные для суппозиториев на гидрофильной основе: подлинность, однородность массы, растворение, однородность дозирования, количественное определение, микробиологическая чистота. В связи с тем, что в качестве показателя качества нами был предусмотрен показатель растворение, испыта-

**Таблица 2. CQAs для разрабатываемых двухкомпонентных суппозиториев**

**Table 2. CQAs for developed two-component suppositories**

Критический параметр качества CQA	Значение Target	Обоснование Justification
Подлинность Identification	Необходимо подтвердить подлинность ДВ качественной реакцией Identification of API is needed to be assured by qualitative test	Подлинность ДВ критична для безопасности и эффективности продукта Identification of API is critical for safety and efficacy of the final product
Однородность массы Content uniformity	В соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Допустимое отклонение от массы суппозитория составляет $\pm 5\%$ In accordance with general pharmacopoeial monograph "Content uniformity of dosage forms". Content uniformity tolerance is 5 % of suppositories mass	Однородность массы суппозиториев необходима для одинаковой дозировки ДВ в каждом суппозитории, а значит эффективности ЛП Content uniformity is needed for the same dosage of each suppository and therefore efficacy of dosage form
Однородность дозирования Dosage uniformity	В соответствии с ОФС «Однородность дозирования». Проводится количественное определение содержания ДВ по отдельности в каждой отобранный для испытания единице ЛП In accordance with general pharmacopoeial monograph "Dosage uniformity". Quantitative assay of API is needed for each suppository selected for testing	Однородность дозирования напрямую влияет на его безопасность и эффективность. Dosage uniformity directly affects safety and efficacy
Распадаемость Disintegration	В соответствии с ОФС «Распадаемость суппозиториев и вагинальных таблеток». Среда – вода с $(36,5 \pm 0,5)$ °C. Время распадаемости суппозиториев не должно превышать 60 мин In accordance with general pharmacopoeial monograph "Disintegration of suppositories and vaginal tablets". Disintegration medium – water $(36,5 \pm 0,5)$ °C. Time of disintegration should not exceed 60 min	Распадаемость влияет на биодоступность ДВ. При наличии испытания Растворение, испытание на распадаемость можно исключить Disintegration affects bioavailability of API. If there is a Dissolution test, the disintegration test can be omitted
Растворение Dissolution	В соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных ЛФ». Среда: раствор фосфатного буфера, температура $37,0 \pm 0,5$ °C. За 45 мин в среду должно перейти не менее 75 % ДВ In accordance with general pharmacopoeial monograph "Dissolution for solid dosage forms". Dissolution medium: phosphate buffer solution, temperature $(37,0 \pm 0,5)$ °C. Within 45 minutes, the medium should contain at least 75 % of API	Показатель влияет на биодоступность. Dissolution affects bioavailability
Количественное определение Assay	Необходимо количественно определить содержание ДВ It is necessary to quantify API in dosage form	От содержания компонентов в ЛП зависит его безопасность и эффективность Quantitative content of components affects safety and efficacy of finished product
Микробиологическая чистота Microbial limits	В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота». Категории 2 In accordance with general pharmacopoeial monograph "Microbial purity". Category 2	Несоответствие показателей микробиологической чистоты может повлиять на безопасность продукта Discrepancy in microbial limits can affect the safety of the product

ние распадаемость решено было в спецификацию не включать.

Для того чтобы установить, как параметры компонентов препарата смогут оказывать влияние на критические показатели его качества, для каждого из действующих веществ, входящих в состав суппозиториев, были определены критические характеристики материалов (CMAs). Для жидких субстанций в соответствии со спецификацией производителя, это могут быть такие показатели как: pH, вязкость, примеси, подлинность, количественное определение, показатель преломления.

Оценка потенциальных рисков для качества в соответствии с Руководством ICH Q9 «Управление рисками для качества» может осуществляться различными методами [6, 10]. Нами был использован метод FMEA. Согласно этой методологии риски качественно оцениваются в категориях «низкий», «средний», «высокий» в зависимости от их влияния на качество продукта. При этом было учтено, что вероятность возникновения риска в производственном процессе не оказывает решающего влияния на его высокую оценку. Любой риск, который может серьезно повлиять на качество конечного продукта, считали высоким, даже если его возникновение было маловероятно. Исходя из этого в таблице 3 представлена классификация рисков по качеству.

Для первоначальной оценки рисков нами были составлены матрицы оценки рисков влияния критических характеристик материалов каждого из компонентов на критические параметры качества продукта. Разработанные матрицы оценки рисков представлены в таблицах 4–6.

**Таблица 3. Параметры оценки рисков**

**Table 3. Risk assessment parameters**

Низкий Low	Допустимый риск. Не требует дальнейшего расследования Acceptable risk. Does not require further investigation
Средний Medium	Приемлемый риск. Возможно проведение расследования для снижения вероятности риска Acceptable risk. Investigation may be carried out to reduce the likelihood of risk
Высокий High	Недопустимый риск. Требуется проведение расследования для снижения вероятности риска Unacceptable risk. Investigation required to mitigate risk

При оценке влияния хлоргексидина биглюконата на критические характеристики конечного продукта одинаково большое внимание было уделено всем параметрам из спецификации производителя. Так как любые отклонения в показателях pH, плотности, наличия родственных веществ и посторонних примесей, количественного определения и подлинности вещества могут сигнализировать о химической непригодности компонента, а, значит, окажут серьезное влияние на параметры подлинности, растворения, однородности дозирования и количественного содержания готового продукта. Эти же CMAs могут оказывать косвенное влияние на параметры микробиологической чистоты, однако, это не является критичным. На однородность массы суппозиториев влияют только параметры технологического процесса. Показатель «описание» в данном случае служит для первичной органолептической оценки материала и может оказывать только косвенное влияние на CQAs.

**Таблица 4. Матрица оценки рисков для хлоргексидина биглюконата**

**Table 4. Matrix of risk assessment for chlorhexidine bigluconate**

	CQAs					
	Подлинность Identification	Однородность массы Content uniformity	Растворение Dissolution	Однородность дозирования Dosage uniformity	Количественное определение Assay	Микробиологическая чистота Microbial limits
Описание Physical description	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low
pH	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Плотность Density	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Родственные вещества Related substances	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Посторонние примеси (4-хлоранилин) Extraneous impurities (4-chloraniline)	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Количественное определение Assay	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Подлинность Identification	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium

**Таблица 5. Матрица оценки рисков для декспантенола**

**Table 5. Matrix of risk assessment for dexamphenol**

	CQAs					
	Подлинность Identification	Однородность массы Content uniformity	Растворение Dissolution	Однородность дозирования Dosage uniformity	Количественное определение Assay	Микробиологическая чистота Microbial limits
Описание Physical description	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low
Количественное определение Assay	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
pH	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	высокий high
Показатель преломления Refraction index	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Удельное оптическое вращение Specific optical rotation	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Вода Water content	средний medium	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	высокий high
Сульфатная зола Sulfated ash	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Свинец Lead	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Примеси (3-аминопропанол) Impurities (3-aminopropanol)	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Остаточные растворители (дихлорметан, метанол) Residual solvents (dichloromethane, methanol)	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Родственные вещества (пантогенная кислота, Д-пантолактон) Related substances (pantoic acid, D-pantolactone)	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium
Подлинность Identification	высокий high	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	средний medium

**Таблица 6. Матрица оценки рисков для ПЭГ-400 и ПЭГ-1500**

**Table 6. Matrix of risk assessment for PEG-400 and PEG-1500**

	CQAs					
	Подлинность Identification	Однородность массы Content uniformity	Растворение Dissolution	Однородность дозирования Dosage uniformity	Количественное определение Assay	Микробиологическая чистота Microbial limits
Описание Physical description	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low	низкий low
pH	средний medium	низкий low	высокий high	средний medium	средний medium	средний medium
Количественное определение Assay	средний medium	низкий low	высокий high	средний medium	средний medium	средний medium
Подлинность Identification	средний medium	низкий low	высокий high	средний medium	средний medium	средний medium
Вода Water content	средний medium	низкий low	высокий high	высокий high	высокий high	высокий high

Влияние СМАс декспантенола на показатели качества готового продукта в целом схоже с таковым хлоргексидина биглюконата. Различие наблюдается лишь во влиянии параметров pH и содержания воды на показатель микробиологической чистоты. В отличие от хлоргексидина биглюконата, обладающего антисептическими свойствами, декспантенол более подвержен микробной контаминации. Наличие воды в декспантеноле также менее критично для показателя подлинности.

В отличие от параметров декспантенола и хлоргексидина биглюконата, влияние СМАс компонентов основы на показатели подлинности, однородности дозирования и количественного определения не критично. Наоборот, значения pH, количественного содержания и подлинности ПЭГ-400 и ПЭГ-1500 оказывают существенное влияние на профиль высвобождения действующих веществ из готового препарата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены данные, необходимые для проведения начального этапа фармацевтической разработки воспроизведенного препарата, двухкомпонентных суппозиториев, в соответствии с Руководством ICH Q8 «Фармацевтическая разработка»: планируемый профиль продукта, критические параметры качества, критические характеристики материалов.

Проведена оценка влияния критических характеристик исходных материалов на критические параметры качества продукта.

В дальнейшем необходимо составить перечень критических параметров процесса, установить допустимые пределы, выход за которые повлечет отклонения в процессе производства суппозиториев, выработать стратегию контроля – определить уровни тревоги и уровня действия для каждой из контрольных точек для обеспечения надлежащего качества продукта, а также составить матрицу оценки рисков влияния критических параметров процессов на критические параметры качества препарата. Полученные данные позволят обосновать состав и технологию двухкомпонентных вагинальных суппозиториев, содержащих хлоргексидина биглюконат и декспантенол.

## ЛИТЕРАТУРА

- Саенко А. Ю., Попова Е. А., Куль И. Я., Петров А. Ю. Маркетинговое исследование суппозиториев, включенных в государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. *Ремедиум*. 2018;3:29–32. DOI: 10.21518/1561-5936-2018-3-29-32.
- Селихова М. С., Агабекян Н. В., Панкратов С. Б. Инновации в лечении родильниц с родовым травматизмом. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2013;4(40):28–31.
- Майоров М. В., Жученко С. И., Черняк О. Л. Местное лечение вагинальных инфекций. *Медичні аспекти здоров'я жінок*. 2017;5(110):27–35.
- Обоскалова Т. А., Кононова И. Н., Ворошилина Е. С., Кузина Т. В. Эффективность реабилитационных мероприятий после деструктивных методов терапии у пациенток с патологией шейки матки, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией. *Акушерство и гинекология*. 2012;2:86–89.

- Зайцева Е. В., Куприянова Н. П., Миняева О. А. Некоторые биофармацевтические и технологические аспекты использования гидрофильных основ для мягких лекарственных форм. *Novainfo*. 2016;43(1):1–7.
- Александров А. В., Дынька Н. В., Жулинский В. А., Карпенко Н. В. ICH Q8: Фармацевтическая разработка. К.: Виалек; 2008. 44 с.
- Пятигорская Н. В., Мешковский А. П., Береговых В. В., Аладышева Ж. И., Беляев В. В., Пятигорский А. М., Иващенко Н. С. Управление изменениями условий регистрации лекарственных препаратов: новое руководство ICH Q12. *Вестник РАМН*. 2018;73(3):181–189 DOI: 10.15690/vramn998.
- Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Метелева В. Д., Флисюк Е. В. Документирование фармацевтической разработки. Часть 1. Изучение документооборота предприятия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):142–147. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-142-147.
- Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Наркевич И. А., Флисюк Е. В., Метелева В. Д. Документирование фармацевтической разработки. Часть 2. Документы системы качества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):147–153. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153.
- Chang R. K., Raw A., Lionberger R., Yu L. Generic Development of Topical Dermatologic Products, Part II: Quality by Design for Topical Semisolid Products. *AAPS J*. 2013;15:674–683. DOI: 10.1208/s12248-013-9472-8.
- Namjoshi S., Dabbagh M., Roberts M. S., Grice J. E., Mohammed Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (Q TPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):287. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030287.

## REFERENCES

- Saenko A. Y., Popova E. A., Kul I. Y., Petrov A. Y. Marketing study of suppositories included in the state register of medicinal products of the Russian Federation. *Remedium*. 2018;3:29–32. (In Russ.) DOI: 10.21518/1561-5936-2018-3-29-32.
- Selikhova M. S., Agabekyan N. V., Pankratov S. B. Innovation in managing obstetric patients with birth trauma. *Volgograd Journal of Medical Research*. 2013;4(40):28–31. (In Russ.)
- Mayorov M. V., Zhuchenko S. I., Chernyak O. L. Local treatment of vaginal infections. *Medical aspects of women's health*. 2017;5(110):27–35. (In Russ.)
- Oboskalova T. A., Kononova I. N., Voroshilina E. S., Kuzina T. V. The effectiveness of rehabilitation measures after destructive methods of therapy in patients with cervical pathology associated with papillomavirus infection. *Obstetrics and Gynecology*. 2012;2:86–89. (In Russ.)
- Zajceva E. V., Kupriyanova N. P., Minyaeva O. A. Some biopharmaceutical and technological aspects of the use of hydrophilic bases for soft dosage forms. *Novainfo*. 2016;43(1):1–7. (In Russ.)
- Aleksandrov A. V., Dyn'ka N. V., Zhulinskij V. A., Karpenko N. V. ICH Q8: Pharmaceutical Development. Krasnodar: Vialek; 2008. 44 p. (In Russ.)
- Pyatigorskaja N. V., Meshkovskij A. P., Beregovih V. V., Aladischeva G. I., Beljaev V. V., Pyatigorskij A. M., Ivaschekhova N. S. Managing changes to drug registration conditions: new guidance ICH Q12. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2018;73(3):181–189. (In Russ.) DOI: 10.15690/vramn998.
- Smekhova I. E., Shigarova L. V., Metelева V. D., Flisyuk E. V. Documentation of Pharmaceutical Development. Part 1. Study of the Documentation of the Site. *Drug development & registration*. 2021;10(1):142–147. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-142-147.
- Smekhova I. E., Shigarova L. V., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Metelleva V. D. Documentation of Pharmaceutical Development. Part 2. Quality System Documents. *Drug development & registration*. 2021;10(2):147–153. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153.
- Chang R. K., Raw A., Lionberger R., Yu L. Generic Development of Topical Dermatologic Products, Part II: Quality by Design for Topical Semisolid Products. *AAPS J*. 2013;15:674–683. DOI: 10.1208/s12248-013-9472-8.
- Namjoshi S., Dabbagh M., Roberts M. S., Grice J. E., Mohammed Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (Q TPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):287. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030287.



## Проблемы нанесения пленочных покрытий при трансфере технологий

А. В. Стрелкова<sup>✉</sup>, Е. В. Флисюк

<sup>1</sup> 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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Стрелкова Анна Владимировна. E-mail: anna.strelkova@pharminnotech.com

ORCID: А. В. Стрелкова – <https://orcid.org/0000-0002-6188-6832>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 07.11.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Трансфер технологий – неотъемлемая часть жизненного цикла любого лекарственного средства. Нанесение оболочки является критически важной стадией в производстве таблеток покрытых оболочкой. Трансфер процесса нанесения пленочной оболочки нередко сопровождается забраковкой части серии лекарственного препарата из-за различных дефектов поверхности

**Цель.** Классифицировать виды дефектов, образующихся на стадии “Нанесение пленочной оболочки” в аппаратах барабанного типа «Коатер», выявить причины возникновения, разработать способы устранения данных дефектов.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования были выбраны таблетки покрытые пленочной оболочкой с МИН диосмин, сildenafilом, дипиридамолом, аторвастатином, розувастатином. Образцы получены на однопуансонном таблеточном прессе EP-1 (ERWEKA GmbH, Германия) и покрыты пленочной оболочкой в установке для нанесения покрытий типа «коатер» BGB-1 (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., Китай).

**Результаты и обсуждение.** Дефекты внешнего вида классифицированы по степени критичности: критические (наплывы, скол, выемка, разрыв, расслоение, разламывание, натир, слипание, пигментация, разнотон, царапины, трещина), значительные (нарост, включение), незначительный дефект. Установлены основные причины возникновения дефекта: свойство таблетки-ядра (например, плохие адгезивные свойства, гидрофобность), технологические параметры ведения процесса (скорость вращения барабана, скорость распыления, давление на распыл, давление на формирование факела, температура входящего воздуха). Рассмотрены основные последствия возникновения каждого вида дефекта среди которых незначительные (не влияющие на качество) и критические (влияющие на показатели качества «растворение»).

**Заключение.** В ходе исследования рассмотрены виды критических и значительных дефектов, причины возникновения и способы устранения данных дефектов.

**Ключевые слова:** дефекты внешнего вида таблеток, нанесение пленочной оболочки, брак покрытия, трансфер технологий

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

**Вклад авторов.** А. В. Стрелкова провела исследовательскую работу обработку результатов. А. В. Стрелкова и Е. В. Флисюк участвовали в обсуждении результатов исследования, 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:** Стрелкова А. В., Флисюк Е. В. Проблемы нанесения пленочных покрытий при трансфере технологий. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):150–159. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-150-159>

## Problems of Applying Film Coatings During Scale-up Technology

Anna V. Strelkova<sup>✉</sup>, Elena V. Flisyuk

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Anna V. Strelkova. E-mail: anna.strelkova@pharminnotech.com

ORCID: Anna V. Strelkova – <https://orcid.org/0000-0002-6188-6832>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 06.09.2022

Revised: 07.11.2022

Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** Technology transfer is an integral part of the life cycle of any drug. The coating is a critical step in the production of coated tablets. The transfer of the film coating application process is often accompanied by the rejection of a part of the drug series due to various defects in the target surface.

**Aim.** To classify the types of defects formed at the stage of “Application of the film shell” in the devices of the “Coater” drum type, to identify the causes of occurrence, to develop ways to eliminate these defects.

**Materials and methods.** Film-coated tablets with INN diosmin, sildenafil, dipyridamole, atorvastatin, rosuvastatin as the object of the study were selected. The samples were obtained on a single-punch tablet press EP-1 (ERWEKA GmbH, Germany) and coated with a film shell in a coating unit of the type “copper” BGB-1 (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., China).

**Results and discussion.** Appearance defects are classified according to the degree of criticality: critical (influx, chipping, recess, rupture, delamination, breaking, rubbing, sticking, pigmentation, discoloration, scratches, crack), significant (build-up, inclusion), minor defect. The main causes of the defect have been established: the property of the core tablet (for example, poor adhesive properties, hydrophobicity), technological

parameters of the process (the speed of rotation of the drum, the speed of spraying, the pressure on the spray, the pressure on the formation of the torch, the temperature of the incoming air. The main consequences of the occurrence of each type of defect are considered, among which are insignificant (not affecting the quality) and critical (affecting the quality indicators of "dissolution").

**Conclusion.** In the course of the study, the types of critical and significant defects, the causes of occurrence and ways to eliminate these defects are considered.

**Keywords:** defects in the appearance of tablets, film coating, coating defects, scale-up technology

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

**Contribution of the authors.** Anna V. Strelkova conducted research work processing the results. Anna V. Strelkova and Elena V. Flisyuk participated in the discussion of the results of the study, writing the text of the article.

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

**For citation:** Strelkova A. V., Flisyuk E. V. Problems of applying film coatings during scale-up technology. *Drug development & registration.* 2022;11(4):150–159. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-150-159>

## ВВЕДЕНИЕ

Трансфер технологий – логичная, контролируемая и задокументированная процедура переноса технологии и методов контроля лекарственного препарата от разработчика к производителю лекарственных средств или от одного производителя лекарственных средств к другому<sup>1</sup>.

Передача технологии может быть внутренней (внутри одного предприятия – от разработки в лаборатории к промышленному производству), совместный (между альянсами производителей), внешней (от заказчика к исполнителю)<sup>2</sup> [1].

Трансфер технологии позволяет расширить возможности производства лекарственных препаратов на территории разных стран, производителей, а также масштабировать процесс [2–5]. Для успешного переноса технологии необходимо наличие сырья, материалов, оборудования, аналитических методик, персонала, документации. Каждая из этих составляющих должна быть оценена на моменте планирования трансфера технологий. Трансфер технологий может включать в себя масштабирование процесса, как в большую сторону (увеличение объемов производства), так и в меньшую (снижение объемов производства). В связи с этим технологическое оборудование должно быть подобным, но не обязательно идентичным<sup>3</sup> [5–9].

<sup>1</sup> К трансферу технологий... Будь готов! Available at: <https://gxpnews.net/2018/11/k-transferu-tehnologij-bud-gotov/> Accessed: 20.12.2021.

<sup>2</sup> Трансфер технологий в фармацевтической отрасли. Available at: [https://archive.promoboz.com/n2\\_19/49-52.pdf](https://archive.promoboz.com/n2_19/49-52.pdf). Accessed: 20.12.2021.

<sup>3</sup> К трансферу технологий... Будь готов! Available at: <https://gxpnews.net/2018/11/k-transferu-tehnologij-bud-gotov/> Accessed: 20.12.2021.

В процессе подбора технологических параметров можно перейти в опасную для качества лекарственного препарата зону, нарушающую стабильность или терапевтическую активность действующего вещества. Ввиду особенностей лекарств, как продукта качества которых потребитель не может оценить самостоятельно [12], необходимо заранее разработать контрольные точки, методики испытаний, которые гарантируют идентичность качества воспроизведенного препарата на новой площадке зарегистрированному ранее. То есть в результате трансфера технологии должен воспроизводиться продукт, обладающей терапевтической активностью и стабильностью при хранении.

Нанесение покрытий на таблетки-ядра является заключительной стадией технологического процесса, не подлежащее дальнейшему исправлению.

Нанесение оболочки решает ряд терапевтических, потребительских, маркетинговых и технологических задач.

К терапевтическим задачам, решаемым с помощью нанесения оболочки можно отнести: модифицированное высвобождение (быстрое, пролонгированное, отсроченное, pH-зависимое, импульсное) действующего вещества, минимизация отрицательного воздействия на слизистые рта, глотки и желудка [13].

К потребительским свойствам относится: маскировка неприятного вкуса и запаха (особенно актуально в педиатрической практике), облегчение проглатывания, идентификация лекарств по цвету, отличительным признакам.

В настоящее время большинство фармкомпаний делают выбор в пользу пленочных покрытий. К достоинствам пленочных покрытий относится:

- небольшая масса оболочки (не более 10 %, как правило 2–3 %) относительно массы таблетки-ядра;
- небольшая толщина оболочки (не более 0,2 мм, как правило 10–20 мкм);
- простота аппаратурного оформления [12].

Изменяя состав оболочки можно варьировать свойствами, достигая желаемые параметры высвобождения лекарственного вещества и терапевтической активности.

Пленочные покрытия могут быть однослойными или многослойными, где каждый слой – имеет разное назначение: защитное, функциональное, эстетическое [13, 14].

Пленочная оболочка придает привлекательный цвет, фактуру поверхности, а также возможность нанесения идентификационных знаков (надписи, рисунки), что относится к решению маркетинговых задач [15, 16].

С технологической точки зрения оболочка увеличивает прочность таблеток (защита от сколов, пыления), стабильность действующего вещества (защита от света, влаги и др.) [15, 17, 18].

Все таблетки, покрытые оболочкой должны удовлетворять требованиям спецификации качества установленной производителем в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи.

На территории Российской Федерации основным нормативным документом, определяющим требования к лекарственным препаратам, контрольные точки, является Государственная Фармакопея. В соответствии с ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки» таблетки, покрытые пленочной оболочкой, должны удовлетворять по показателям: описание, растворение, распадаемость, количественное определение, однородность массы [19].

Обнаружение несоответствия даже по одному показателю может привести к значительным финансовым издержкам из-за списания загрузки / серии / компании препарата. Для предотвращения или минимизации риска повторного появления дефектов на таблетках, покрытых пленочной оболочкой необходимо выяснить причины, разработать и внедрить предупреждающие действия.

В литературных источниках [10] приведена статистика количества забракованных серий и причин несоответствия – показателей качества. Наиболее часто встречающейся причиной является несоответствие по показателю описание, наличие механических включений, неудовлетворительное количественное определение (растворение, распадаемость)<sup>1</sup>.

## Описание

Внешний вид таблеток, покрытых пленочной оболочкой, определяется производителем, ввиду большого разнообразия форм, цвета, маркировки, наличие риски. Если не обосновано другое, то поверхность должна быть гладкой и однородной [20].

<sup>1</sup> Филоненко Е. Виды и причины дефектов оболочки таблеток при нанесении в дражировочном котле. Available at: <https://pharm-community.com/2017/7233/> Accessed: 06.03.2022

## Тест «Растворение»

В рамках рутинного производства твердых лекарственных форм за определение количества активной фармацевтической субстанции в дозе лекарственного препарата отвечает тест «Растворение», показывающий количество перешедшего в среду растворения действующего вещества за определенное количество времени. Среда растворения, период растворения выбирается на стадии разработки лекарственного препарата для определения приблизительной биоэквивалентности. Тест «Растворение» является универсальным инструментом при контроле качества твердых дозированных лекарственных форм для определения: скорости высвобождения активной фармацевтической субстанции, оценки стабильности препарата, оценки свойств модифицированного и контролируемого высвобождения, проверки качества полупродукта и готового продукта (в любое время от производства до истечения срока годности), определения фальсифицированной продукции. Методика теста «Растворение» должна быть способна выявлять изменения в лекарственной форме или в процессе производства, а также те изменения, которые могут влиять на эффективность и безопасность лекарственного средства [21].

## Тест «Распадаемость»

Распадаемость – показатель качества твердых дозированных лекарственных форм, показывающих способность лекарственного средства распадаться на составляющие части (сuspension, взвесь, рыхлую массу) в жидкой среде за определенный промежуток времени [20].

**Целью данного исследования** является определение видов, причин несоответствия показателям качества таблеток, покрытых пленочной оболочкой, и предложить корректирующие меры для устранения несоответствия в будущем.

В хронологической последовательности показатель качества «Описание» определяется в первую очередь. При обнаружении значительных дефектов можно предсказать несоответствие по другим показателям.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны таблетки покрытые пленочной оболочкой с МНН диосмин, силденафил, дипиридамол, аторвастатин, розувастатин. Образцы получены на однопуансонном таблеточном прессе EP-1 (ERWEKA GmbH, Германия) и покрыты пленочной оболочкой в установке для нанесения покрытий типа «коатер» BGB-1 (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., Китай). Внешний вид таблеток покрытых пленочной оболочкой был оценен, обнаруженные дефекты классифи-

цированы. Собрана статистическая информация зависимости появления дефектов от технологических параметров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Дефекты внешнего вида таблеток покрытых пленочной оболочкой можно классифицировать:

1. По степени влияния:

- Оказывающие влияние на фармакологическое действие (нарушающие растворения, распадаемости, стабильности).
- Не влияющие на фармакологическое действие (дефекты внешнего вида).

2. По причине возникновения:

- Сырье.
- Оборудование.
- Персонал.
- Процесс нанесения оболочки.
- Процесс таблетирования.

3. По тяжести последствий:

- *Критический дефект* – обуславливающий невозможность дальнейшего использования полупродукта, требующий списания загрузки / серии / компании препарата.
- *Значительный дефект* – значительно влияет на внешний вид, но с учетом адекватного количества можно использовать полупродукт на дальнейших стадиях производственного процесса после пересмотра и отбраковки.
- *Незначительный дефект* – дефект внешнего вида, не требующий корректировки.

Дефекты внешнего вида, рекомендуется определять визуально на расстоянии 30 см при искусственном освещении, без использования дополнительного оборудования.

### Критические дефекты

1. *Наплыв* – непреднамеренное утолщение оболочки. В начальной стадии может выражаться в виде шероховатой поверхности, напоминающей апельсиновую корку (целлюлит). Кроме эстетического несовершенства может ухудшиться распадаемость и растворение таблетки из-за утолщения слоя покрытия (рисунок 1).

Причины возникновения целлюлита / наплыва могут быть связаны с неправильно подобранными технологическими параметрами:

- недостаточная температура входящего воздуха (слишком влажная поверхность таблетки во время нанесения покрытия);
- большой поток суспензии (большой размер капли, большая скорость распыления);
- слишком маленькое расстояние от форсунки до слоя таблеток;
- неправильный угол распыления форсунки;



Рисунок 1. Наплыв

Figure 1. Cold lap

- или с физико-химическими свойствами таблеток-ядер или покрывающей сусpenзии;
- вздутие таблетки из-за набухания входящих в ее состав компонентов;
- недостаточная прочность таблеток-ядер;
- выделение газов таблетками-ядрами;
- слишком низкое содержание пластификатора в покрывающей сусpenзии.

Для решения сложившейся проблемы на моменте разработки состава таблеток, покрытых пленочной оболочкой, можно подобрать оптимальный состав пленкообразующей сусpenзии, увеличив количество пластификаторов и/или полимеров. Альтернативным решением является использование подложки – нанесение тонкого слоя защитного покрытия, препятствующего проникновению влаги к ядру таблетки. Использование этих способов могут увеличить продолжительность времени распадаемости и растворения таблеток покрытых пленочной оболочкой.

При возникновении наплыва на моменте трансфера / масштабирования технологии, когда манипуляции с составом невозможны, необходимо варьировать технологическими параметрами, добиваясь распыления в условиях меньшей влажности:

- уменьшение скорости распыления пленкообразующей сусpenзии;
- увеличение расстояния от форсунки до слоя таблеток;
- увеличение температуры входящего воздуха.

2. *Сколы*.

Сколы на таблетках покрытых пленочной оболочкой могут быть открытыми (рисунок 2, а) или закрытыми (рисунок 2, б).

*Открытый скол* – это повреждение оболочки, приводящий к изменению физико-химических свойств. Снижается устойчивость к влаге, свету, что может негативно сказаться на стабильность или целевую доставку действующего вещества.

*Закрытый скол* – скол, покрытый пленочной оболочкой (рисунок 2, б), образовавшийся в процессе таблетирования, при загрузке в барабан коатера или в начале процесса нанесения пленочной оболочки. Вероятность образования закрытых сколов в середине или в конце процесса нанесения оболочки крайне мала.

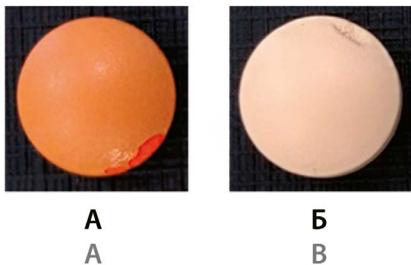


Рисунок 2. Сколов:

А – открытый скол; Б – закрытый скол

Figure 2. Sheared surface:

A – accessible sheared surface; B – closed sheared surface

Причинами сколов (откалывания оболочки) может быть форма и свойства таблеток-ядер, технологические параметры, свойства пленкообразующей супензии:

- таблетки-ядра слишком мягкие;
- таблетки-ядра слишком влажные;
- острые края таблеток;
- механическая нагрузка на таблетки-ядра во время загрузки / выгрузки;
- высокая скорость вращения барабана;
- слишком низкая скорость распыления раствора;
- слишком высокое механическое напряжение на таблетки;
- недостаточная прочность покрытия.

Для предотвращения возникновения сколов можно оптимизировать рецептуру таблеток-ядер, увеличив их механическую прочность, однако при увеличении прочности может нарушиться высвобождение активной фармацевтической субстанции. Изменение системы загрузки / выгрузки снижает механическую нагрузку. При подборе технологических параметров следует:

- ✓ Использовать интервальный «шаговый» режим при прогревании таблеток-ядер.
- ✓ Снижать скорость вращения барабана.
- ✓ Увеличивать скорость подачи пленкообразующей супензии.
- ✓ Распылять раствор пленкообразующей оболочки в условиях меньшей влажности.

3. Выемка – видимое нарушение толщины оболочки, которая может ускорить продолжительность высвобождения действующего вещества, нарушив пролонгированный эффект или целевую доставку действующего вещества (рисунок 3).

Данный дефект может образоваться из-за плохих адгезивных свойств полимеров в составе пленкообразующей супензии, слишком гладкой поверхности таблеток-ядер, залипов на стадии таблетирования (прилипание к верхним или нижним пуансонам).

Для увеличения шероховатости поверхности таблеток ядер необходимо уменьшить давление прессования (изменение шероховатости будет невиди-



Рисунок 3. Выемка

Figure 3. Sheared surface

мо человеческому глазу). Другие способы устранения данного дефекта приводят к перерегистрации лекарственного препарата из-за изменения состава. Например, можно использовать другие полимеры в составе пленкообразующей супензии, подложки или антиадгезионных агентов,

4. Разрывы оболочки образуются при слипании таблеток и дальнейшем их разделении или прилипании таблеток к барабану коатера во время процесса нанесения пленочной оболочки. В месте повреждения оболочки ядро таблетки ничем не защищено, что приведет к неравномерному выделению действующих веществ, нарушению целевой доставки действующих веществ (рисунок 4).

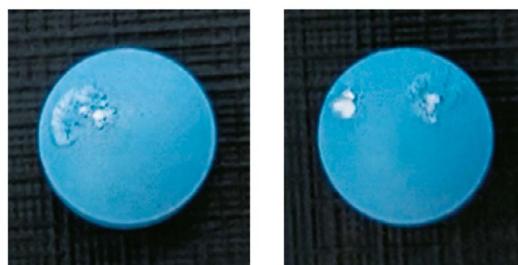


Рисунок 4. Разрыв оболочки

Figure 4. Casing breakage

Возможные причины – неправильно подобранные технологические параметры, при которых образуется высокая влажность во время процесса поверхность таблетки не успевает высыхать и слипается с другими таблетками:

- низкая скорость вращения барабана;
- низкая температура входящего воздуха;
- небольшой расход воздуха;
- слишком высокая скорость распыления.

Для предотвращения слипания таблеток необходимо подобрать параметры, при которых будет более эффективная сушка таблеток:

- увеличить скорость вращения барабана;
- повысить температуру входящего (выходящего) воздуха;
- увеличить поток (расход) воздуха;
- снизить скорость распыления;
- поддерживать более высокую температуру слоя таблеток.

5. Не целая таблетка (рисунок 5), расслоившаяся таблетка (рисунок 6) – нарушение целостности таблеток-ядер, приводящее к изменению массы, количественного содержания действующих веществ. Выводы о причинах возникновения данного дефекта можно сделать на основании количества некондиционных таблеток. Если таких таблеток несколько штук, то скорее всего причиной стало механическое воздействие при сборе и/или загрузке таблеток-ядер. Если некондиционных таблеток – значительный процент от загрузки, то причинами может быть:
- недостаточная механическая прочность у таблетки-ядра;
  - пережатие таблеток-ядер (большое давление прессования);
  - конструкция таблеточного-пресса (таблетки ядра, полученные на таблетпрессах ударного типа более подвержены расслоения);
  - слишком высокая скорость вращения барабана.

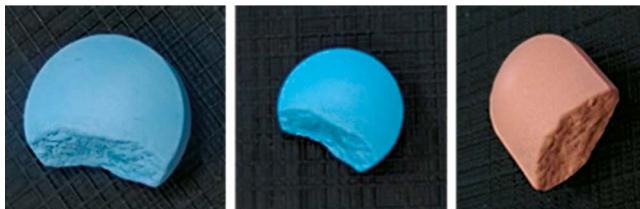


Рисунок 5. Не целая таблетка

Figure 5. Break tablet



Рисунок 6. Расслоение

Figure 6. Breakage

Для предотвращения возникновения расколов и расслоений стоит вернуться на стадию таблетирования и подобрать давление прессования, высоту таблеток-ядер. При выгрузке и загрузке таблеток ядер необходимо минимизировать падения и другие механические воздействия. На стадии нанесения пленочной оболочки стоит подобрать щадящие параметры: температуру в слое таблеток, скорость распыления, скорость вращения барабана.

6. Потертости или натиры – образующиеся пятна черного цвета на самой выпуклой части таблетки. На таблетках в форме «облонг» или «лодочка» выражаются в виде полос черного цвета. Как правило образуется из-за трения таблеток с металлическими частями (барабаном или лопастями) барабана коатера. Также черные полосы могут возникать из-за большого количества диоксида тита-

на в составе пленочной оболочки. Помимо эстетического несовершенства в местах натиров может истончаться оболочка. Последствия истончения оболочки приведут к нарушению стабильности при хранении, нарушению целевой доставки действующих веществ (рисунок 7).



Рисунок 7. Потертость

Figure 7. Roughness

Для предотвращения образования натиров рекомендуется снизить количество диоксида титана в составе оболочки или минимизировать контакт с металлическими поверхностями. Рекомендуется выгружать таблетки покрытые пленочной оболочкой в пластиковые емкости с помощью пластиковых совков. В технологический процесс ввести подготовительный этап – матирование барабана коатера с помощью нанесения тонкого слоя оболочки на поверхности барабана и лопасти. Матирование барабана снизит контакт таблеток с металлическими частями коатера. Для матирования барабана необходимо использовать такую же оболочку как и для нанесения на таблетки-ядра. После проведения матирования необходимо хорошо просушить барабан коатера. Если оболочка не просохнет, от в процессе работы таблетки будут сдирать оболочку с барабана и образуется другой вид дефекта – пигментация.

#### 7. Бабочки (слипшиеся таблетки).

Слипшиеся таблетки невозможно зафасовать в одну ячейку блистера, при их разделении нарушается целостность оболочки (переход в дефект «разрыв оболочки») (рисунок 8).

Слипание таблеток происходит при повышенной влажности во время процесса, которая могла образоваться по многим технологическим причинам:

- слишком низкий расход воздуха;
- высокая скорость подачи пленкообразующей супензии;
- наложение / перекрывание струй пленкообразующей супензии от разных форсунок;
- большой размер капли распыляемой форсункой (неправильно подобрано давление сжатого воздуха на распыление и/или формирование факела);
- низкая температура отводимого воздуха, вследствие чего наносимый раствор не успевает высохнуть и происходит слипание таблеток;
- слишком близкое расположение форсунки к слою таблеток, приводящее к их чрезмерному увлажнению и также к слипанию [12];
- неподходящая для покрытия форма таблетки.



Рисунок 8. Слипшиеся таблетки

Figure 8. Double tablet

Для предотвращения слипания таблеток необходимо уменьшить влажность, держать температуру в слое таблеток более высокую (таблетки должны быть теплыми и сухими) для этого рекомендуется подобрать параметры ведения процесса:

- снизить скорость распыления;
- повысить производительность сушки (увеличить температуру входящего воздуха);
- изменить угол подачи пленкообразующей супензии на таблетки;
- изменить расстояния между форсункой и слоем таблеток.

Если слипание таблеток происходит из-за неправильно подобранной формы таблеток-ядер, необходимо изменить форму на оптимальную (например, двояковыпуклую) или использовать в рецептуре пленочного покрытия антиадгезионные агенты.

8. *Пигментация (разводы / точки)*. На таблетках покрытых пленочной оболочкой образуются цветные пятна, не однородный цвет. Негативного влияния на качество продукта не оказывает (рисунок 9).



Рисунок 9. Пигментация (разводы, точки)

Figure 9. Tanning (blotchiness, sharpening)

Причины возникновения пигментации как правило связаны с ненадлежащей подготовкой к процессу [12]:

- плохое смешивание раствора оболочки перед его нанесением;
- слишком низкая скорость нанесения;
- неправильная настройка форсунок, приводящая к перекрыванию струй раствора при распылении на таблетки;

- неодинаковый размер капель спрея вследствие технической неисправности или засорения форсунки;
- неправильный размер факела (перекрывание от разных форсунок);
- засорение форсунки;
- распыление пены в конце процесса.

Другая группа причин – неправильно подобранный состав оболочки из-за чего:

- фармацевтическая субстанция взаимодействует с материалом оболочки;
- низкая покрывающая способность оболочки;
- перенос активных компонентов из ядра таблетки;
- слишком высокое содержание твердого вещества в супензии.

Если возникновение пигментации связано с ведением технологического процесса, стоит:

- увеличить продолжительность растворения красителя;
- изменить угол распыления форсунок;
- повысить температуру в слое таблеток;
- постоянно перемешивать пленкообразующую супензию для избежания оседания пигментов на дно емкости;
- исключить подачу остатка пленкообразующей супензии (пены).

При недостижении однородного цвета варьируя технологическими параметрами можно ввести перевалку – увеличить количество наносимой оболочки или:

- скорректировать рецептуру / заменить используемые пигменты;
- снизить содержание твердого вещества;
- улучшить покрывающую способность оболочки;
- использовать подложку для защиты ядра от взаимодействия с оболочкой.

9. *Разноцвет / разнотон* (рисунок 10).



Рисунок 10. Разнотон

Figure 10. Diversity of colours

При образовании разнотона в рамках одной загрузки необходимо измерить массу таблеток покрытых пленочной оболочкой, если масса приблизительно одинаковая, то появление разнотона наиболее вероятно, из-за:

- низкой покрывающей способности оболочки;
- недостаточного количества оболочки в процентном отношении к ядру;
- слишком малого объема загрузки.

Для предотвращения образования разнотона на лучше ввести перезакладу (увеличить количество оболочки) или на стадии разработки увеличить количество пигмента в составе оболочки.

10. Царапина – повреждение целостности таблетки или таблетки-ядра. Аналогично сколам царапины могут образовываться на таблетках-ядрах на стадии таблетирования, например, при контакте с отсекателем таблетпресса, при загрузке или во время нанесения оболочки. То есть царапины могут быть открытыми и закрытыми. В месте образования царапины толщина оболочки может быть меньше, из-за чего может нарушиться равномерность выделения действующих веществ, целевая доставка действующих веществ (рисунок 11).

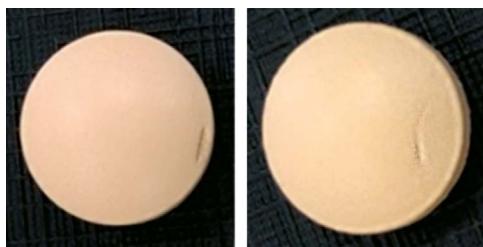


Рисунок 11. Царапина

Figure 11. Scar

На стадии нанесения пленочной оболочки причинами возникновения царапин являются:

- слишком высокая скорость вращения барабана;
- острые края таблеток-дер;
- слишком низкая скорость распыления раствора;
- недостаточная прочность покрытия;
- контакт с лопастями барабана.

Для предотвращения царапания таблеток можно:

- снизить скорость вращения барабана;
- изменить рецепт пленкообразующей супензии (подобрать оптимальные свойства пластификатора);
- минимизировать контакт с острыми элементами.

11. Трецина на стадии покрытия оболочкой возникает в начале процесса. Из-за нарушения целостности таблетки-ядра оболочка в месте разрыва может лечь неравномерно, что приведет к неравномерному или преждевременному высвобождению действующего вещества (рисунок 12).

Как правило данный дефект возникает из-за свойств таблетки-ядра:

- дефект таблетки ядра (кристаллообразование);
- разбухание таблетки-ядра вследствие поглощения избытка влаги.

Также образование трещин может быть связано с неподходящими условиями сушки (что приводит к переувлажнению ядра) или низкой прочность оболочки на разрыв [12].

Для недопущения образования трещин необходимо:

- снизить температуру входящего воздуха;



Рисунок 12. Трецина

Figure 12. Fissure

- варьировать расходом пленкообразующей супензии.

Также можно ввести подложку (предварительное покрытие таблеток) или уменьшить давление прессования на таблетировании.

### Значительные дефекты

1. "Нарост / налив / бородавка более 1 мм – эстетическое несоответствие, отрицательное влияние на качество отсутствует (рисунок 13)."



Рисунок 13. Налип / нарост / бородавка

Figure 13. Accretion / stick / verruca

Причины возникновения налипов – технологические ошибки на стадии нанесения оболочки:

- слишком маленькое расстояние между форсункой и слоем таблеток;
- низкая температура отводимого воздуха (не досушивание слоя таблеток);
- в растворе оболочки присутствуют пузырьки воздуха. Например, из-за образования пены при слишком быстром перемешивании;
- подача воздуха для распыления неравномерная или засорение форсунки;
- слишком низкая скорость вращения;
- запыленность таблеток.

Чтобы предотвратить образование налипов необходимо следовать советам:

- увеличить расстояние между форсункой со слоем таблеток;
- изменить угол нанесения пленкообразующей супензии;
- увеличить температуру и/или расход воздуха;
- проводить дегазацию супензии;

- очищать форсунку перед началом процесса;
  - дополнительно обеспыливать таблетки-ядра.
2. *Точка / механическое включение*. При образовании инородных точек (механических включений) на поверхности таблеток покрытых оболочкой необходимо выяснить причины возникновения: сырье, оборудование, персонал. С точки зрения качества механическое включение опасности не несет, при подозрении на металлическую природу можно пропустить таблетки через металлодетектор (рисунок 14).

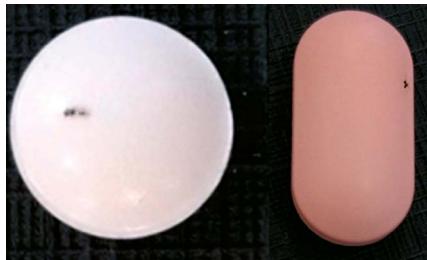


Рисунок 14. Точка / механическое включение  
Figure 14. Sharpening / particulate matter

Если точка сырьевая (из оболочки) необходимо фильтровать приготовленную супензию, например, через 2 слоя синтетической ткани 55 Па, однако функциональные супензии фильтровать нельзя. Если точки связаны с оборудованием, необходимо более тщательно очищать оборудование, проверять целостность и засорённость фильтров. Если точки образовались на стадии таблетирования и не закрылись, то необходимо искать причину на предыдущей стадии.

3. *Ворсинка* (рисунок 15).



Рисунок 15. Ворсинка  
Figure 15. Villi

Появление ворсинки на поверхности таблеток связано с некачественной подготовкой персонала, оборудования, технологических сред или загрязненности сырья. Негативного влияния на качество данный дефект не несет. Для предотвращения появления этого дефекта следует пересмотреть процедуры подготовки персонала, технологических сред и оборудования, если ворс в сырье – работать с поставщиками или просеивать сырье.

4. *Другой цвет (не однородный цвет)* – эстетический дефект, при котором сквозь оболочку проходит цвет ядра, при соответствующей массе таблетки покрытой оболочкой негативного влияния на качество не несет (рисунок 16).



Рисунок 16. Другой цвет  
Figure 16. Other color

Основной причиной возникновения является низкая покрывающая способность оболочки или недостаточное количество оболочки в процентном отношении к ядру.

Для устранения данного дефекта можно добавить большее количество пигментов, улучшив покрывающую способность оболочки или ввести перезакладку, если позволяет масса таблетки, растворимость и распадаемость.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансфер технологий на стадии нанесения пленочной оболочки – сложный процесс, который может сопровождаться рядом проблем, оказывающих отрицательное влияние на качество продукта. При возникновении какого-либо дефекта необходимо выяснить причины и принять меры для их устранения. Трансфер технологий можно считать успешным, когда стablyно получается продукт надлежащего качества, соответствующего всем показателям нормативной документации / спецификации качества. Для этого могут потребоваться значительные изменения параметров нанесения оболочки, процесса приготовления оболочки, процесса подготовки персонала / оборудования к работе, при необходимости работа с поставщиками / замена поставщиков, а также изменение параметров на предыдущей стадии технологического процесса – таблетировании.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Конников Д. Л., Сидоров К. О., Ильинова Ю. Г. Трансфер технологий в фармацевтической отрасли: проблемы, влияющие на результат. В сб.: VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Инновации в здоровье нации". Санкт-Петербург: Изд. ФГБОУ ВО СПХФУ; 2019. С. 230–233.
2. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ системы организации фармацевтической разработки лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;20(3):170–176.
3. Pröpich A., am Ende M. T., Katschner T., Lubczyk V., Weyhers H., Bernhard G. Drug product modeling predictions for scale-up of tablet film coating – a quality by design approach. *Compu-*

- ters & chemical engineering.* 2010;34(7):1092–1097. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2010.03.006.
4. Cunningham C., Hansell J., Nuneviller III, F., Rajabi-Siahboomi A. R. Evaluation of recent advances in continuous film coating processes. *Drug development and industrial pharmacy.* 2010;36(2):227–233. DOI: 10.3109/03639040903410326.
  5. Niblett D., Porter S., Reynolds G., Morgan T., Greenamoyer J., Hach R., Gabbott I. Development and evaluation of a dimensionless mechanistic pan coating model for the prediction of coated tablet appearance. *International journal of pharmaceutics.* 2017;528(1–2):180–201. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.060.
  6. Басевич А. В., Дзюба А. С., Каухова И. Е., Третьякова А. Е., Сахаров В. А. Оригинальный алгоритм действий при подготовке нового лекарственного препарата производителем лекарственных средств. Стадия 2. Трансфер технологий. *Формулы Фармации.* 2021;3(1):18–30. DOI: 10.17816/phf48535.
  7. Kureck H., Govender N., Siegmann E., Boehling P., Radeke C., Khinast J. G. Industrial scale simulations of tablet coating using GPU based DEM: a validation study. *Chemical Engineering Science.* 2019;202:462–480. DOI: 10.1016/j.ces.2019.03.029.
  8. Mueller R., Kleinebudde P. Prediction of tablet velocity in pan coaters for scale-up. *Powder technology.* 2007;173(1):51–58. DOI: 10.1016/j.powtec.2006.11.016.
  9. Демина Н. Б. Фармацевтическая разработка: обзор оборудования для лабораторной разработки и наработки опытных партий твердых лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016;(1):38–46.
  10. Тельнова Е. А. О системе контроля качества лекарственных средств. *Вестник Росздравнадзора.* 2010;4:10–16.
  11. Магилюк В. Обзор функциональных пленочных покрытий для пероральных твердых лекарственных форм. *Специальный выпуск «Ингредиенты для фармации» «Фармацевтическая отрасль».* 2015;48:88–95.
  12. Чернобаева М. В., Хусам С., Скатков С. А., Демина Н. Б., Пленочные покрытия пероральных лекарственных форм. *Фармация.* 2010;8:45–51.
  13. Коцур Ю. М., Флисюк Е. В. Современные полимеры в технологии таблеток с пролонгированным высвобождением. *Формулы фармации.* 2020;2(1):36–43. DOI: 10.17816/phf21267.
  14. Boehling P., Toschkoff G., Knop K., Kleinebudde P., Just S., Funke A., Khinast J. G. Analysis of large-scale tablet coating: Modeling, simulation and experiments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016;90:14–24. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.12.022.
  15. Ruotsalainen M., Heinämäki J., Guo H., Laitinen N., Yliruusi J. A novel technique for imaging film coating defects in the film–core interface and surface of coated tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2003;56(3):381–388. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00118-8.
  16. Seo K. S., Bajracharya R., Lee S. H., Han H. K. Pharmaceutical application of tablet film coating. *Pharmaceutics.* 2020;12(9):1–20. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090853.
  17. Boehling P., Toschkoff G., Dreu R., Just S., Kleinebudde P., Funke A., Khinast J. G. Comparison of video analysis and simulations of a drum coating process. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017;104:72–81. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.03.031.
  18. Saikh M. A. A. Aqueous film coating the current trend. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* 2021;11(4-S):212–224. DOI: 10.22270/jddt.v11i4-S.4911.
  19. Олефир Ю. В., Саканян Е. И., Шишова Л. И. Фармакопейные требования к качеству лекарственных препаратов Химико-фармацевтический журнал. 2018;52(11):48–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-11-48-54.
  20. Ковалева Е. Л., Багирова В. Л., Миткина Л. И., Матвеева О. А. Совершенствование методологических подходов к стандартизации препаратов в лекарственной форме «таблетки». Химико-фармацевтический журнал. 2009;43(12):26–35.
  21. Смехова И. Е., Перова И. А., Кондратьева Ю. М. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2013;1(2):50–61.
- participation "Innovations in the health of the nation". St. Petersburg: Ed. FGBOU VO SPHFU; 2019. P. 230–233. (In Russ.)
2. Rozhnova S. A., Tsypkina A. V. Analysis of the system organization of pharmaceutical drug development. *Drug development & registration.* 2017;3(170–176. (In Russ.)
  3. Prpich A., am Ende M. T., Katschner T., Lubczyk V., Weyhers H., Bernhard G. Drug product modeling predictions for scale-up of tablet film coating – a quality by design approach. *Computers & chemical engineering.* 2010;34(7):1092–1097. DOI: 10.1016/j.compchemeng.2010.03.006.
  4. Cunningham C., Hansell J., Nuneviller III, F., Rajabi-Siahboomi A. R. Evaluation of recent advances in continuous film coating processes. *Drug development and industrial pharmacy.* 2010;36(2):227–233. DOI: 10.3109/03639040903410326.
  5. Niblett D., Porter S., Reynolds G., Morgan T., Greenamoyer J., Hach R., Gabbott I. Development and evaluation of a dimensionless mechanistic pan coating model for the prediction of coated tablet appearance. *International journal of pharmaceutics.* 2017;528(1–2):180–201. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.060.
  6. Basevich A. V., Dzuba A. S., Kaukhova I. E., Tretyakova A. E., Sakharov V. A. The development of an algorithm for introduction of a new drug on the existing pharmaceutical production. Stage 2. Transfer of technologies. *Pharmacy Formulas.* 2021;3(1):18–30. (In Russ.) DOI: 10.17816/phf48535.
  7. Kureck H., Govender N., Siegmann E., Boehling P., Radeke C., Khinast J. G. Industrial scale simulations of tablet coating using GPU based DEM: a validation study. *Chemical Engineering Science.* 2019;202:462–480. DOI: 10.1016/j.ces.2019.03.029.
  8. Mueller R., Kleinebudde P. Prediction of tablet velocity in pan coaters for scale-up. *Powder technology.* 2007;173(1):51–58. DOI: 10.1016/j.powtec.2006.11.016.
  9. Diomina N. B. Pharmaceutical development: review of equipment for laboratory development and pilot batches production of solid dosage forms. *Drug development & registration.* 2016;1(1):38–46. (In Russ.)
  10. Telnova E. A. About the quality control system of medicines. *Vestnik Roszdravnadzora.* 2010;4:10–16. (In Russ.)
  11. Magilyuk V. Review of functional film coatings for oral solid dosage forms. Special issue "Ingredients for pharmacy" "Pharmaceutical industry Review". 2015;48:88–95. (In Russ.)
  12. Chernobaeva M. V., Husam S., Skatkov S. A., Demina N. B., Film coatings of oral medicinal products form. *Pharmacy.* 2010;8:45–51. (In Russ.)
  13. Kotsur Yu. M., Flisyuk E. V. Modern polymers in the technology of tablets with prolonged release. *Pharmacy Formulas.* 2020;2(1):36–43. (In Russ.)
  14. Boehling P., Toschkoff G., Knop K., Kleinebudde P., Just S., Funke A., Khinast J. G. Analysis of large-scale tablet coating: Modeling, simulation and experiments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016;90:14–24. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.12.022.
  15. Ruotsalainen M., Heinämäki J., Guo H., Laitinen N., Yliruusi J. A novel technique for imaging film coating defects in the film–core interface and surface of coated tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2003;56(3):381–388. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00118-8.
  16. Seo K. S., Bajracharya R., Lee S. H., Han H. K. Pharmaceutical application of tablet film coating. *Pharmaceutics.* 2020;12(9):1–20. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090853.
  17. Boehling P., Toschkoff G., Dreu R., Just S., Kleinebudde P., Funke A., Khinast J. G. Comparison of video analysis and simulations of a drum coating process. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017;104:72–81. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.03.031.
  18. Saikh M. A. A. Aqueous film coating the current trend. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* 2021;11(4-S):212–224. DOI: 10.22270/jddt.v11i4-S.4911.
  19. Olefir Yu. V., Sakanian E. I., Shishova L. I. Pharmacopoeial requirements for the quality of medicines. *Chemical and Pharmaceutical Journal.* 2018;52(11):48–54. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-11-48-54.
  20. Kovaleva E. L., Bagirova V. L., Mitzkina L. I., Matveeva O. A. Improvement of methodological approaches to standardization of drugs in the dosage form "tablets". *Chemical and Pharmaceutical Journal.* 2009;43(12):26–35. (In Russ.)
  21. Smekhova I. E., Perova I. A., Kondrat'eva Yu. M. The "Dissolution" test and modern approaches to assessing the equivalence of medicines. *Drug development & registration.* 2013;1(2):50–61. (In Russ.)

## REFERENCES

1. Konikov D. L., Sidorov K. O., Ilinova Yu. G. Technology transfer in the pharmaceutical industry: problems affecting for the result. In: VII All-Russian scientific-practical conference with international



*Оригинальная статья / Research article*

## Разработка препаративного способа получения энантиомерно чистой субстанции сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии

**В. Н. Царев<sup>✉</sup>, Н. Г. Базарнова, И. В. Микушина**

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» (АлтГУ), 656049, Россия, Алтайский край, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 61

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Царев Виталий Николаевич. E-mail: tsarewvn@yandex.ru

ORCID: В. Н. Царев – <https://orcid.org/0000-0003-1236-9692>; Н. Г. Базарнова – <https://orcid.org/0000-0002-4539-2744>; И. В. Микушина – <https://orcid.org/0000-0003-1280-7154>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 19.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Все большее количество исследований, проводимых в различных странах в области биофармации, убедительно показывают различия физиологического воздействия на организм человека стереоизомеров фармацевтических субстанций. Как правило один из энантиомеров оказывает необходимое фармакологическое воздействие, другой энантиомер либо инертен, либо проявляет негативное побочное влияние. В настоящее время актуальным является получение энантиомерно чистых фармакологических субстанций из их рацемических смесей.

**Цель.** Получение R-изомера сальбутамола из рацемической смеси сальбутамола и разработка препартивной методики хирального разделения методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) с достаточным для производственного процесса выходом целевого продукта.

**Материалы и методы.** Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) широко используется для проведения аналитических и препартивных разделений энантиомеров фармацевтических субстанций. Актуальность использования сверхкритической флюидной хроматографии СФХ обусловлена в большей мере тем, что в качестве основного компонента подвижной фазы (ПФ) в ней используется суб- или сверхкритический диоксид углерода (СК-СО<sub>2</sub>). Исследования проводили на полупрепартивном Investigator SFC (Waters Corporation, США) и препартивном Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) сверхкритических флюидных хроматографах, с PDA-детекторами. Образцы взвешивали с точностью до 0,0001 г на весах XPE206DR (Mettler Toledo, США).

**Результаты и обсуждение.** Изучен процесс хирального разделения сальбутамола сульфата методом СФХ на Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США). Выявлено, что в хроматографической системе в сверхкритических условиях происходит разделение соли на кислотный и основный остатки, что значительно снижает производительность и сокращает продолжительность непрерывной работы хроматографа. Разработаны условия препартивного хирального разделения рацемической смеси сальбутамола основания на R- и S-изомеры с высокими энантиоселективностью и производительностью. Полученный R-изомер сальбутамола основания может быть переведен в фармсубстанцию в виде сульфата или другой соли, без потери энантиомерной чистоты, S-изомер может быть подвергнут рацемизации и последующему использованию.

**Заключение.** Разработан препартивный способ хирального разделения рацемической смеси сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) с выходом целевого продукта (R-изомера) 5,5 г в смену (8 часов).

**Ключевые слова:** сверхкритическая флюидная хроматография, энантиомерно чистая субстанция сальбутамола основания, препартивный способ хирального разделения

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

**Вклад авторов.** В. Н. Царев осуществлял проведение экспериментов полупрепартивного и препартивного хиральных разделений сальбутамола сульфата и сальбутамола основания методом СФХ. Н. Г. Базарнова, И. В. Микушина осуществляли концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. Статья написана при участии всех соавторов и согласования ими итоговой версии.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность компании ОАО «Алтайвитамины» за предоставленную возможность выполнения работы на препартивном сверхкритическом флюидном хроматографе (СФХ) Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США), коллективу лаборатории сверхкритических флюидных технологий Института общей и неорганической химии имени Н. С. Курнакова РАН (ИОНХ РАН) за помощь в разработке физико-химического обоснования процессов при разработке аналитической методики хирального разделения сальбутамола сульфата методом СФХ.

**Для цитирования:** Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Микушина И. В. Разработка препартивного способа получения энантиомерно чистой субстанции сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):160–169. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-160-169>

## Development of a Preparative Method for Obtaining an Enantiomerically Pure Substance of Salbutamol by Supercritical Fluid Chromatography

**Vitaly N. Tsarev<sup>✉</sup>, Natalya G. Bazarnova, Irina V. Mikushina**

Altai State University, 61, prospekt Lenina, Barnaul, Altai Territory, 656049, Russia

<sup>✉</sup> Corresponding author: Vitaly N. Tsarev. E-mail: tsarewvn@yandex.ru

ORCID: Vitaly N. Tsarev – <https://orcid.org/0000-0003-1236-9692>; Natalya G. Bazarnova – <https://orcid.org/0000-0002-4539-2744>; Irina V. Mikushina – <https://orcid.org/0000-0003-1280-7154>.

Received: 06.09.2022      Revised: 19.10.2022      Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** An increasing number of studies conducted in various countries in the field of biopharmacy convincingly show the differences in the physiological effects on the human body of stereoisomers of pharmaceutical substances. As a rule, one of the enantiomers has the necessary pharmacological effect, the other enantiomer is either inert or has a negative side effect. Currently, it is important to obtain enantiomerically pure pharmacological substances from their racemic mixtures.

**Aim.** Obtaining the R-isomer of salbutamol from a racemic mixture of salbutamol and developing a preparative procedure for chiral separation by supercritical fluid chromatography (SFC) with a yield of the target product sufficient for the production process.

**Materials and Methods.** Supercritical fluid chromatography (SFC) is widely used for analytical and preparative separations of enantiomers of pharmaceutical substances. The relevance of the use of supercritical fluid chromatography SFC is largely due to the fact that it uses sub- or supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) as the main component of the mobile phase (MP). Studies were carried out on semi-preparative Investigator SFC (Waters Corporation, USA) and preparative Prep 200 qSFC (Waters Corporation, USA) supercritical fluid chromatographs with PDA detectors. Samples were weighed to the nearest 0.0001 g on a XPE206DR balance (Mettler Toledo, USA).

**Results and discussion.** The process of chiral separation of salbutamol sulfate by the SFC method on Prep 200 qSFC (Waters Corporation, USA) was studied. It was revealed that in the chromatographic system under supercritical conditions, the salt is separated into acidic and basic residues, which significantly reduces productivity and shortens the duration of continuous operation of the chromatograph. Conditions for the preparative chiral separation of the racemic mixture of salbutamol base into R- and S-isomers with high enantioselectivity and productivity have been developed. The resulting R-isomer of salbutamol base can be converted into the pharmaceutical substance in the form of sulfate or other salt without loss of enantiomeric purity, the S-isomer can be subjected to racemization and subsequent use.

**Conclusion.** A preparative method has been developed for the chiral separation of a racemic mixture of salbutamol by supercritical fluid chromatography (SFC) with a yield of the target product (R-isomer) of 5.5 g per shift (8 hours).

**Keywords:** supercritical fluid chromatography, enantiomerically pure substance of salbutamol base, preparative method of chiral separation

**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.** Vitaly N. Tsarev carried out experiments on semi-preparative and preparative chiral separations of salbutamol sulfate and salbutamol base by the SFC method. Natalya G. Bazarnova, Irina V. Mikushina carried out the conceptualization and methodology of the study, as well as reviewing and correcting the article. The article was written with the participation of all co-authors and their approval of the final version.

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude to the JSC "Altaivitaminy" for the opportunity to perform the work on a Prep 200 qSFC (Waters Corporation, USA) preparative supercritical fluid chromatograph (SFC), to the staff of the laboratory of supercritical fluid technologies of the N. S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (IGIC RAS) for assistance in developing the physicochemical substantiation of processes in the development of an analytical procedure for the chiral separation of salbutamol sulfate by the SFC method.

**For citation:** Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Mikushina I. V. Development of a preparative method for obtaining an enantiomerically pure substance of salbutamol by supercritical fluid chromatography. *Drug development & registration.* 2022;11(4):160–169. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-160-169>

## ВВЕДЕНИЕ

Сальбутамол – β<sub>2</sub>-адреностимулятор из ряда 1,2-аминоспиртов (рисунок 1), жизненно необходимый и важнейший лекарственный препарат для медицинского применения, который используется в ингаляционной форме в качестве бронхолитика<sup>1</sup>.

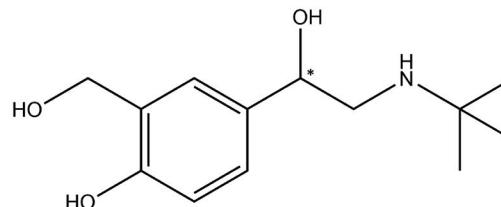


Рисунок 1. Структурная формула сальбутамола

Figure 1. Structure of salbutamol

Сальбутамол – хирамльное соединение, которое чаще всего для приготовления лекарственных препаратов используется в виде рацемической смеси. Необходимой фармакологической активностью обладает

<sup>1</sup> Распоряжение Правительства Российской Федерации от 12.10.2019 № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2020 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». Доступно по: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_335635/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/). Ссылка активна на 27.01.2020.

только его R-энантиомер [1], в то время как S-энантиomer проявляет минимальное сродство к  $\beta_2$ -адренорецепторам и оказывает побочные негативные реакции [2]. Разнонаправленное действие энантиомеров характерно не только для сальбутамола [3], но и практически для всех фармацевтических субстанций, используемых в виде рацемических смесей. В настоящее время активно разрабатывают способы хиральной очистки или разделения рацемических смесей с целью получения энантиомерно чистых фармакологических субстанций [4–6]. Институт химии и химико-фармацевтических технологий Алтайского государственного университета в сотрудничестве с институтом общей и неорганической химии имени Курнакова РАН г. Москва и ОАО «Алтайвитамины» в рамках проекта «Создание высокотехнологичного производства жизненно важного лекарственного противоастматического препарата «сальбутамол» в аэрозольной форме на основе энантиомерно чистой, микронизированной субстанции, получаемой с помощью сверхкритических флюидных технологий», разработали аналитическую методику хирального разделения сальбутамола сульфата методом сверхкритической флюидной хроматографии [7]. Аналитический способ получения R-изомера сальбутамола сульфата методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) защищен патентом № RU 2 727 890 C1 [8].

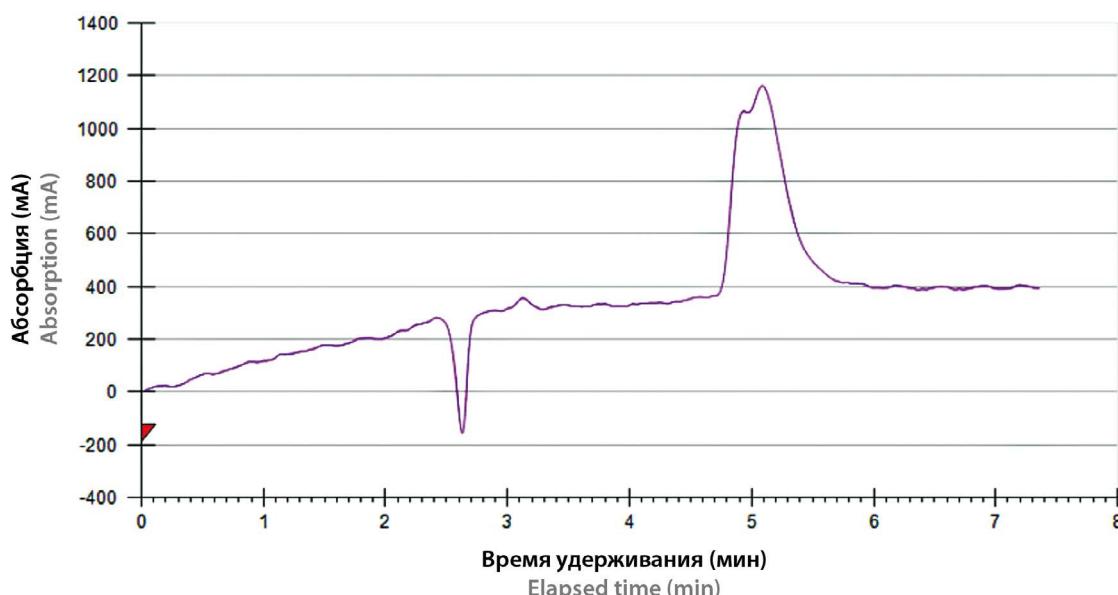
При апробации аналитической методики хирального разделения рацемической смеси сальбутамола сульфата на промышленном хроматографе Prep

200 qSFC (Waters Corporation, США) получены результаты с низкой селективностью (рисунок 2). Кроме того, хроматографическая система бесперебойно работала не более 30 минут, далее происходил аварийный сбой системы, необходимо было промывать фиттру, и запускать хроматограф заново.

Для осуществления процесса масштабирования аналитической или полупрепартивной [9] методик необходимо выявить влияние ряда условий препартивного хроматографирования, таких как природа сорбента [10], состав подвижной фазы, тип и содержание динамического модификатора [11] или модификаторов, влияние давления в хроматографическом тракте и температуры процесса.

Параметры рабочего давления установки составляют 120 бар, скорость подачи элюента в хроматографическом тракте 200 г в минуту. Диаметр препартивной колонки (30 мм) не позволяет применять систему терmostатирования, поскольку невозможен равномерный прогрев колонки по всему объему.

Таким образом, учитывая вышеизложенное, для разработки условий препартивного хирального разделения рацемической смеси сальбутамола сульфата необходим подбор параметров, влияющих на селективность разделения рацемической смеси только таких как химическая природа аналита (соль или основание), состав подвижной фазы, природа сорбторителя и его доля в подвижной фазе, природа модификаторов.



**Рисунок 2.** Хроматограмма энантиомеров сальбутамола сульфата, полученная при апробации аналитической методики с параметрами: ПФ-сверхкритический  $\text{CO}_2$ :метанол (80:20), динамический модификатор-изопропиламин (ИПА) 1 об. %, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вкота 2 мл, концентрация аналита 3 г/л на препартивном хроматографическом комплексе Prep 200 qSFC

**Figure 2.** Chromatogram of the enantiomers of salbutamol sulfate, obtained by testing the analytical method with the following parameters: PF-supercritical  $\text{CO}_2$ :methanol (80:20), dynamic modifier-isopropylamine (IPA) 1 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 200 g/min, injection volume 2 ml, analyte concentration 3 g/l on preparative chromatographic complex Prep 200 qSFC

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали растворы сальбутамола сульфата и сальбутамола основания с концентрацией от 1,0 до 3,0 г/л и 86,0 г/л соответственно. Навески рацемических смесей сальбутамола отвешивали на весах XPE206DR balance (Mettler Toledo, США) с точностью до 0,0001 г, переносили в мерные калибранные колбы на 200 мл (Колба 1-200 СН с градуированной горловиной), вносили 100 мл метанола, помещали в лабораторный встряхиватель LOIP LS-220 (ЛАБ-ПУ-04), через 15 мин вынимали колбы из встряхивателя и доводили уровень метанола до метки. Полученные растворы отфильтровывали от механических примесей через фильтр белая лента и переносили в пробоприемник (500 мл) светлого стекла. Профильтрованные растворы хранили в плотно укупоренной таре темного стекла, при температуре от 2 до 20 °C в течение 24 часов с момента приготовления.

Хроматографические исследования проводили на препаративном комплексе Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США). Диапазон условий: скорость потока подвижной фазы 200 г/мин; что соответствует рабочему параметру для СФХ системы Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) и неизменно; состав подвижной фазы CO<sub>2</sub>/MeOH варьировали от 70/30 % до 90/10 %; давление в хроматографическом тракте изменяли от 100 до 200 бар; сорбент – Chiraldak IG (Chiral Technologies, США); объем вводимой пробы от 0,1 до 2,0 мл. Детектирование осуществляли при длинах волн 225 и 276 нм, что соответствует максимумам поглощения аналита. Все эксперименты проводили в изократическом режиме.

Время удерживания аналита определяли по вершине хроматографического пика. За мертвое время (время выхода неудерживаемого компонента,  $t_0$ ) принимали время первого возмущения базовой линии, обычно связываемого с выходом растворителя образца.

Основные параметры хроматографического исследования вычисляли с помощью стандартных формул:

$$k = (t_r - t_0)/t_0'$$

где  $k$  – коэффициент удерживания;  $t_0$  – мертвое время;  $t_r$  – время удерживания вещества.

Коэффициент асимметрии пика As вычисляли в виде отношений ширин правого и левого фронтов пика, измеренного у основания. Коэффициент селективности разделения двух энантиомеров рассчитывали, как отношение коэффициента удерживания более удерживаемого энантиомера к коэффициенту удерживания менее удерживаемого. Ширину фронта пика измеряли от максимума пика до точки перехода фронта в базовую линию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важных этапов при разработке способа хроматографического разделения энантиомеров является выбор хирального сорбента [12]. Несмотря на многочисленные исследования [13], до сих пор не предложено алгоритма поиска сорбента для хиральных разделений [14, 15]. Комплекс Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) был оснащен препартивной колонкой 250 × 30 Chiraldak IG с сорбентом на базе химически привитой к силикагелю (иммобилизованной) амилозы, с трис-3-хлор-5-метилфенилкарбаматными заместителями [16, 17]. Ранее, в работе [18] была показана возможность хирального разделения сальбутамола сульфата с использованием сорбента на базе химически привитой к силикагелю (иммобилизованной) амилозы, с трис-3-хлор-5-метилфенилкарбаматными заместителями. Этот сорбент был использован нами при разработке способа препартивного хирального разделения рацемической смеси субстанций сальбутамола сульфата и сальбутамола основания.

Подвижная фаза в СФХ как правило включает CO<sub>2</sub> в сверхкритическом флюидном состоянии и сорасторитель, в котором анализ имеет максимальную растворимость.

В качестве растворителей сальбутамола сульфата для препартивных СФХ разделений исследовали метanol, этанол, ацетонитрил, изопропиловый спирт, диметилсульфоксид.

Низкие значения растворимости сальбутамола сульфата в ацетонитриле и изопропиловом спирте приводят к низкой производительности работы хроматографа. Кроме того, при низкой растворимости и соответственно низкой концентрации субстанции происходит выпадение разделяемой субстанции в осадок в хроматографическом пути, что ведет к вынужденной остановке системы и ее промывке.

Экспериментально доказано, что образование осадка аналита в хроматографическом пути связано с понижением его растворимости из-за снижения полярности ПФ в сверхкритическом состоянии ниже предела растворимости аналита. Таким образом, сорасторитель помимо высокой растворяющей способности, должен быть максимально полярным. Образование осадка субстанции в колонке приводит к ее неисправности. Сальбутамол сульфат имеет невысокую растворимость в этаноле. При контакте ионного соединения сальбутамола сульфата с трехкомпонентной ПФ – CO<sub>2</sub>-EtOH-H<sub>2</sub>O происходит высыпание. Это приводит к невоспроизводимому искажению форм пиков сальбутамола, а также, возможно, к частичной преципитации сальбутамола сульфата в хроматографическом пути, что проявляется в постепенном росте перепада давления между насосом и регулятором давления, по мере выполнения последовательности вколов, а также в постепенной дестабилизации работы регулятора давления.

Два других растворителя – диметилсульфоксид (ДМСО) и гексафтормапропанол (ГФИП), хорошо смешиваются со  $\text{CO}_2$  и позволяют обеспечить высокую растворимость сальбутамола сульфата в ПФ. Однако использование их для хирального препартивного разделения не целесообразно. ДМСО интенсивно взаимодействует с сорбентами колонок и практически блокирует удерживание на них других веществ. Кроме того, ДМСО несовместим с неиммобилизованными полисахаридными фазами, так как способен десорбировать их с силикагеля и тем самым разрушить хиральную колонку. ГФИП образует с различными функциональными группами хиральных селекторов прочные водородные связи и препятствует контакту хиральных центров сорбции с целевыми веществами, тем самым нивелируя энантиоселективность. Кроме того, при попытках использования ГФИП как сорасторовителя в СФХ для разделения энантиомеров сальбутамола сульфата наблюдали очень большие уширения пиков. Фактически регистрировали не хроматографические пики, характерные для элюентной хроматографии, а растянутое во времени постепенное вымывание сальбутамола сульфата с колонок.

При изучении растворителей, в том числе доступных литературных данных [19], установлено, что в качестве сорасторовителя для элюирования сальбутамола сульфата (солевой формы) в СФХ целесообразно использовать только метанол. Кроме того, с экономической точки зрения, применение метанола в качестве сорасторовителя является более выгодным в препартивном разделении в условиях фармацевтического производства.

Состав ПФ является одним из принципиальных факторов, определяющим удерживание, селективность разделения и форму хроматографических пиков. Повышение содержания сорасторовителя приводит к росту растворяющей способности ПФ по отношению к аналитам, сокращению времен удерживания, коэффициентов удерживания, а также к частичному подавлению тейлинга, если таковой проявляется. Влияние доли сорасторовителя на коэффициенты селективности более сложно и в общем случае *a priori* непредсказуемо. Поэтому подбор доли сорасторовителя для препартивных энантиомерных разделений, в которых селективность является ключевым вкладом в разрешение – необходимый шаг оптимизации способа и методики СФХ разделения рацемической смеси на отдельные энантиомеры.

Приемлемой степенью селективности для препартивного разделения является такая ее величина, при которой имеется возможность настроить алгоритм сбора фракций с оптической чистотой не менее 97 %.

Теоретически, для выбора конкретного значения доли сорасторовителя в подвижной фазе необходимо учитывать влияние доли сорасторовителя на форму пиков в нелинейном режиме, при перегрузе колонки. В этих условиях большое значение приобретает учет

совместного влияния сорасторовителя и растворителя образца на формы пиков.

Экспериментально доказано, что при уровне сорасторовителя в подвижной фазе 16 % степень селективности достаточна для настройки алгоритма сбора чистых энантиомеров сальбутамола сульфата (рисунок 3).

Для повышения производительности была предпринята попытка в качестве добавки к основному сорасторовителю (метанолу) использовать ГФИП. В присутствии ГФИП растворимость сальбутамола сульфата в метаноле увеличивается при увеличении доли ГФИП в смеси растворителей (таблица 1).

**Таблица 1. Изменение растворимости сальбутамола сульфата в метаноле в зависимости от добавляемой объемной доли ГФИП**

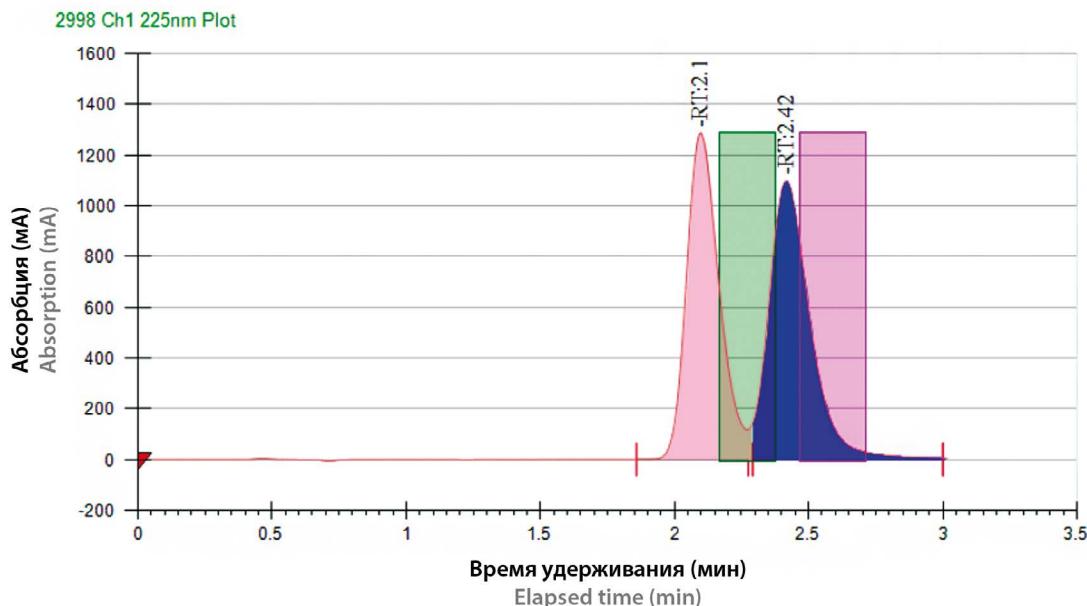
**Table 1. Change in the solubility of salbutamol sulfate in methanol depending on the added volume fraction of HFIP**

№	Форма сальбутамола Form of salbutamol	Растворимость, г/л (при н.у.) Solubility, g/l (at n.c.)					
		ГФИП 0,5% HFIP 0,5%	ГФИП 1,0% HFIP 1,0%	ГФИП 2,5% HFIP 2,5%	ГФИП 5,0% HFIP 5,0%	ГФИП 10,0% HFIP 10,0%	CH <sub>3</sub> OH
1	Сальбутамол сульфат Salbutamol sulfate	50	90	180	260	400	3

Использование раствора сальбутамола сульфата в сочетании с ГФИП резко сократило продолжительность безаварийной работы с 30 до 5 минут в зависимости от концентрации аналита. Наблюдалась линейная зависимость уменьшения времени безаварийной работы от роста концентрации сальбутамола сульфата.

Основной причиной аварийной остановки комплекса Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) являлся критический перепад давлений между насосом высокого давления и автоматическим регулятором обратного давления. Перепад давлений выше допустимого происходит за счет химического взаимодействия в системе сверхкритический  $\text{CO}_2$  – метанол – ГФИП – сальбутамола сульфат, в результате которого образуется осадок, нерастворимый в подвижной фазе. Образующийся осадок задерживается на предколонке, что ведет к увеличению перепада давления вплоть до критического.

Из полученных экспериментальных данных очевидно, что препартивное хиральное разделение сальбутамола сульфата проводить как технологически, так и экономически не целесообразно. Дальнейшие эксперименты по хиральному препартивному разделению проводили на субстанции сальбутамол основание. Растворимость сальбутамола основания в метаноле составляет 86 г/л, что обеспечивает производительность работы от 3,5 до 5,5 г чистого R-изомера сальбутамола основания в рабочую смену. Время



**Рисунок 3. Хроматограмма энантиомеров сальбутамола сульфата, демонстрирующая визуализацию алгоритма сбора R- и S-изомеров сальбутамола сульфата в условиях: ПФ-сверхкритический CO<sub>2</sub>:метанол (84:16), динамический модификатор-изопропиламин 1,0 об. %, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вколов 2 мл, концентрация аналита 3 г/л**

**Figure 3. Chromatogram of the enantiomers of salbutamol sulfate, showing the visualization of the algorithm for collecting the R- and S-isomers of salbutamol sulfate under the conditions: PF-supercritical CO<sub>2</sub>:methanol (84:16), dynamic modifier-isopropylamine 1.0 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 200 g/min, injection volume 2 ml, analyte concentration 3 g/l**

безаварийной работы комплекса Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) увеличилось с 0,5 до 595 часов.

Проведена серия экспериментов препаративного хирального разделения сальбутамола основания с разным составом ПФ. Найдены условия, позволяющие получить высокую селективность и оптическую чистоту целевых продуктов, причем без использования добавок к сорасторовителю – метанолу в виде ГФИП и динамических модификаторов, типа диэтил- или триэтиламинов, которые использовали в аналитическом и полупрепартивном способах. Полагаем, что это результат высокой растворимости сальбутамола основания в метаноле. Условия препаративного хирального разделения субстанции сальбутамола основания защищены патентом RU 2 727 890 C1, патентодержатель – ЗАО (теперь ОАО) «Алтайвитамины» [20].

Достигнута полная воспроизводимость результатов (рисунок 4) одиночных вколов, сделанных с разницей 7 часов между ними.

Как следует из полученных результатов (рисунок 4), в течение рабочей смены сохраняется стабильность и качество хирального разделения, что отражается в постоянстве времен удерживания изомеров и коэффициентов селективности.

Результаты серийного хирального хроматографического разделения сальбутамола основания в режиме производственного цикла представлены на рисунке 5.

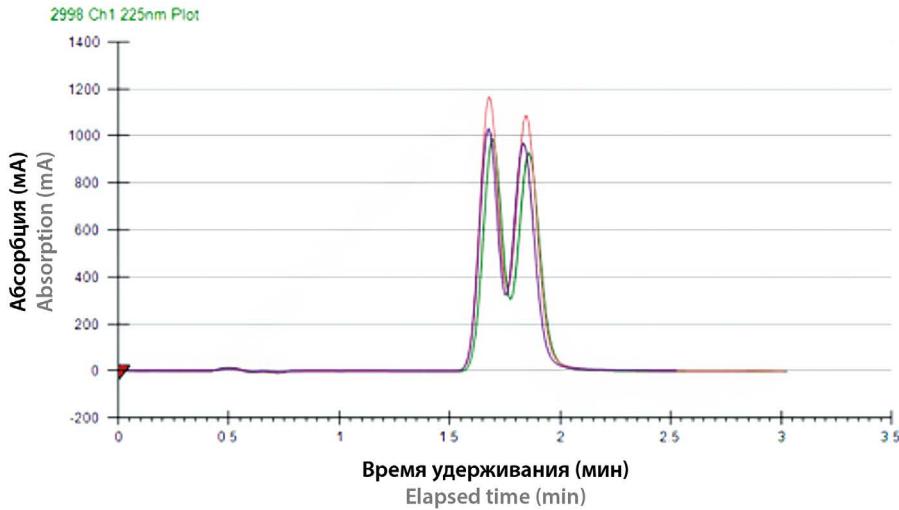
Содержание R-изомера сальбутамола основания в целевом продукте контролировали, используя аналитический режим сверхкритического хроматографа

Investigator SCF (Waters Corporation, США). Полученные результаты представлены на рисунке 6. Как следует из представленного рисунка, хроматограмма целевого продукта имеет один выраженный пик, время удерживания которого совпадает с временем удерживания, характерным для R-изомера сальбутамола основания, определенным ранее в аналитическом режиме в аналогичных условиях на сверхкритическом хроматографе Investigator SCF (Waters Corporation, США) при анализе рацемической смеси сальбутамола основания. Количественное содержание R-изомера сальбутамола основания в целевом продукте определяли по площади пика.

Чистота пяти последовательно полученных, в течение рабочей недели, энантиомерных фракций сальбутамола основания в предложенных условиях составила более 98 % (таблица 2).

Остаточное количество рацемической смеси энантиомеров в сбросе подвижной фазы (рисунок 7, определяемое в аналитическом режиме на СКФ хроматографе Investigator SCF) находится на уровне следовых количеств.

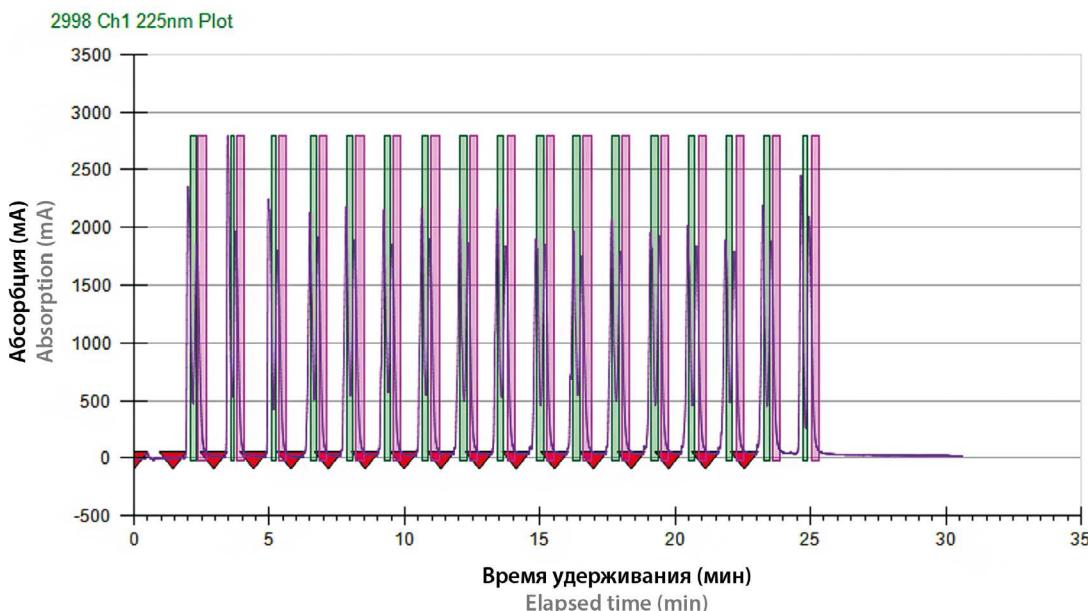
В ходе проведенного эксперимента оптимальными для препаративного хирального способа разделения сальбутамола основания методом сверхкритической флюидной хроматографии на СКФ хроматографе Prep 200 qSFC, следует считать: состав ПФ сверхкритический CO<sub>2</sub>:метанол (84:16), динамический модификатор-отсутствует, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вколов 0,86 мл, концентрация аналита 85 г/л.



№	Маркер Marker	Время/дата Time/Date
1	■	08:00/09.10.20
2	□	15:00/09.10.20
3	■	22:00/09.10.20

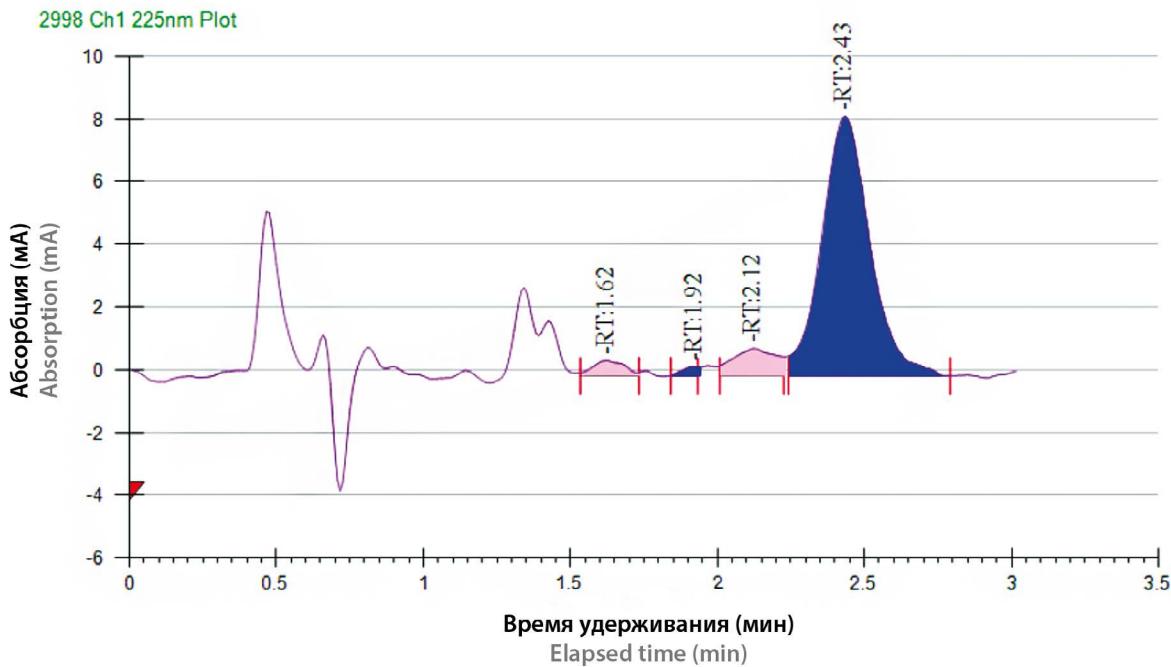
**Рисунок 4.** Хроматограммы энантиомеров сальбутамола основания, полученные с временным интервалом 7 часов на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSCF, демонстрирующие воспроизводимость процесса хиального разделения сальбутамола основания

**Figure 4.** Chromatograms of enantiomers of salbutamol base obtained with a time interval of 7 hours on a Prep 200 qSCF preparative chromatographic complex, demonstrating the reproducibility of the chiral separation of salbutamol base



**Рисунок 5.** Хроматограмма серийного разделения энантиомеров сальбутамола основания в условиях: ПФ-сверхкритический CO<sub>2</sub>:метанол (84:16), динамический модификатор-отсутствует, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вкло 0,86 мл, концентрация аналита 80 г/л, на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSCF

**Figure 5.** Chromatogram of serial separation of enantiomers of salbutamol base under the conditions: PF-supercritical CO<sub>2</sub>:methanol (84:16), no dynamic modifier, pressure 120 bar, flow rate 200 g/min, injection volume 0.86 ml, analyte concentration 80 g/l, on the Prep 200 qSCF preparative chromatographic complex



**Рисунок 6.** Хроматограмма целевого продукта R-изомера сальбутамола основания, полученная в аналитическом режиме: ПФ-сверхкритический  $\text{CO}_2$ :метанол (84:16), динамический модификатор-изопропиламин 1,0 об. %, давление 120 бар, скорость потока 5 мл/мин, объем вкюла 10 мкл, концентрация аналита 0,01 г/л на сверхкритическом хроматографе Investigator SCF

**Figure 6.** Chromatogram of the target product of the R-isomer of salbutamol base, obtained in the analytical mode: PF-supercritical  $\text{CO}_2$ :methanol (84:16), dynamic modifier isopropylamine 1.0 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 5 ml/min, injection volume 10  $\mu\text{l}$ , analyte concentration 0.01 g/l supercritical chromatograph Investigator SCF



**Рисунок 7.** Остаточное количество смеси энантиомеров в сбросе подвижной фазы исследованное в аналитическом режиме в условиях: ПФ-сверхкритический  $\text{CO}_2$ :метанол (84:16), динамический модификатор-изопропиламин 1,0 об. %, давление 120 бар, скорость потока 5 мл/мин, объем вкюла 10 мкл, на СКФ хроматографе investigator SCF

**Figure 7.** Residual mixture of enantiomers in the discharge of the mobile phase studied in the analytical mode under the conditions: PF-supercritical  $\text{CO}_2$ :methanol (84:16), dynamic modifier isopropylamine 1.0 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 5 ml/min, injection volume 10  $\mu\text{l}$ , on investigator SCF chromatograph

**Таблица 2. Содержание R-изомера сальбутамола основания в целевом продукте различных партий после энантиомерного разделения рацемической смеси на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSCF**

**Table 2. The content of the R-isomer of salbutamol base in the target product of various batches after enantiomeric separation of the racemic mixture on the Prep 200 qSCF preparative chromatographic complex**

Дата наработки партии Batch run date	Содержание R-изомера, % Content of R-isomer, %	Среднее The average	Стандартное отклонение Standard deviation
10.10.20	97,87	98,08	$\pm 0,38$
11.10.20	98,56		
12.10.20	97,98		
13.10.20	98,04		
14.10.20	97,95		

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе масштабирования способа хирального разделения рацемической смеси сальбутамола сульфата на отдельные изомеры установлено, что происходит разделение соли на основную и кислотную части, что не позволяет получить целевой продукт с высокими выходом, оптической чистотой и производительностью. В связи с этим, для препаративных хиральных разделений предложено использовать субстанцию сальбутамола основания в виде рацемической смеси.

Подобраны условия препаративного сверхкритического флюидного хроматографического хирального разделения фармсубстанции сальбутамол основание на промышленном сверхкритическом флюидном хроматографе Prep 200 qSCF (Waters Corporation, США).

Достигнуты достаточные для производственного процесса выход целевого продукта (R-изомер сальбутамола основания), составляющий не менее 97 г в рабочую смену (8 часов) и энантиомерная чистота целевого продукта не менее 97 %.

## ЛИТЕРАТУРА

- Penn R. B., Frielle T., McCullough J. R., Aberg G., Benovic J. L. Comparison of R-, S-, and RS-albuterol interaction with human  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1996;14(1):37–45. DOI: 10.1007/BF02772201.
- Milgrom H. Levosalbutamol in the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006;7(12):1659–1668. DOI: 10.1517/14656566.7.12.1659.
- Patel M., Thomson N. C. (R)-salbutamol in the treatment of asthma and chronic obstructive airways disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011;12(7):1133–1141. DOI: 10.1517/14656566.2011.571210.
- Василенко И. А., Лебедева М. В., Листров В. А. Оптические изомеры в фармацевтике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;1(10):92–104.
- Gensh K. V., Gensh T. S., Bazarnova N. G. Chiral supercritical fluid chromatography of 1,2-aminoalcohols (review). *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019;13(7):1095–1102. DOI: 10.1134/S1990793119070066.
- Микушина И. В., Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Геныш К. В., Чепрасова М. Ю., Сысоева А. В., Паренаго О. О. Условия аналитического хирального разделения 1-(4-гидрокси-3-(гидроксиметил)фенил)-2-((6-(1-метил-3-фенилпропокси)гексил)амино)этанола. Тезисы докладов X Научно-практической конференции с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации». 30 сентября – 06 октября 2019. Ростов-на-Дону: Дон; 2019. С. 135–137.
- Микушина И. В., Базарнова Н. Г., Паренаго О. О., Геныш К. В., Чепрасова М. Ю. К вопросу об изучении сорбции при хиральном разделении энантиомеров сальбутамола и салметерола методом сверхкритической флюидной хроматографии. *Журнал СФУ. Химия*. 2019;12(3):310–318. DOI: 10.17516/1998-2836-0128.
- Покровский О. И., Паренаго О. О., Лунин В. В. Способ селективного разделения рацемической смеси сальбутамола. Патент РФ на изобретение RU 2667002 С1. 13.09.2018. Доступно по: <https://patenton.ru/patent/RU2667002C1>. Ссылка активна на 24.07.2020.
- Mikushina I. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Cheprasova M. Yu., Sysoeva A. V., Sysoev A. V., Kushnir E. Yu., Gensh K. V. The Development of a Method for the Preparative Separation of Salbutamol Enantiomers by Supercritical Fluid Chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020;14(7):1142–1147. DOI: 10.1134/S1990793120070143.
- Roy D., Armstrong D. W. Fast super/subcritical fluid chromatographic enantioseparations on superficially porous particles bonded with broad selectivity chiral selectors relative to fully porous particles. *Journal of Chromatography A*. 2019;1605:360339. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.06.060.
- Костенко М. О., Покровский О. И., Паренаго О. О., Лунин В. В. Влияние типа и концентрации добавок подвижной фазы на разделение энантиомеров сульфата сальбутамола в сверхкритической жидкостной хроматографии. *Вестник Отделения химических наук Академии наук*. 2018;67(11):1997–2002. DOI: 10.1007/s11172-018-2320-3.
- Wu S. G., Lin A. Y., Hsieh H. Y., Tsui H. W. Elucidation of adsorption mechanisms of solvent molecules with distinct functional groups on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based sorbent. *Journal of Chromatography A*. 2016;1460:123–134. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.024.
- Berthod A. Chiral recognition in separation methods: mechanisms and applications. Heidelberg: Springer; 2010. 337 p.
- Cardoso P. A., César I. C. Chiral method development strategies for HPLC using macrocyclic glycopeptide-based stationary phases. *Chromatographia*. 2018;81(6):841–850. DOI: 10.1007/s10337-018-3526-0.
- Halabi A., Ferrayoli C., Palacio M., Dabbene V., Palacios S. Validation of a chiral HPLC assay for (R)-salbutamol sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(1):45–51. DOI: 10.1016/j.jphap.2003.08.020.
- Rosales-Conrado N., Dell'Aica M., de León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M. Determination of salbutamol by direct chiral reversed-phase HPLC using teicoplanin as stationary phase and its application to natural water analysis. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(11):1413–1422. DOI: 10.1002/bmc.2937.
- Gazić I., Bosak A., Šinko G., Vinković V., Kovarić Z. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;385(8):1513–1519. DOI: 10.1007/s00216-006-0566-3.
- Kostenko M. O., Ustinovich K. B., Pokrovskiy O. I., Bazarnova N. G., Lunin V. V. Effect of the Mobile Phase Composition on Selectivity in Supercritical Fluid Chromatography in the Separation of Salbutamol Enantiomers. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2018;12(7):1166–11751. DOI: 10.1134/S1990793118070059.
- Ali H. S., York P., Blagden N., Khoubnasabjafari M., Acree Jr. W. E., Jouyban A. Solubility of salbutamol and salbutamol sulphate in ethanol + water mixtures at 25 °C. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;173:62–65. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.05.021.

20. Сысоев А. В., Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Кушнир Е. Ю., Геньш К. В., Чепрасова М. Ю., Микушина И. В., Сысоева А. В. Способ препаративного разделения рацемического сальбутамола основания с применением сверхкритической флюидной хроматографии. Патент РФ на изобретение RU 2727890 C1. Доступно по: <https://patenton.ru/patent/RU2348455C2>. Ссылка активна на 24.07.2020.

## REFERENCES

1. Penn R. B., Frielle T., McCullough J. R., Aberg G., Benovic J. L. Comparison of R-, S-, and RS-albuterol interaction with human  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2-adrenergic receptors. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1996;14(1):37–45. DOI: 10.1007/BF02772201.
2. Milgrom H. Levosalbutamol in the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006;7(12):1659–1668. DOI: 10.1517/14656566.7.12.1659.
3. Patel M., Thomson N. C. (R)-salbutamol in the treatment of asthma and chronic obstructive airways disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011;12(7):1133–1141. DOI: 10.1517/14656566.2011.571210.
4. Vasilenko I. A., Lebedeva M. V., Listrov V. A. Optical isomers in pharmaceuticals. *Drug development & registration*. 2015;1(10):92–104. (In Russ.)
5. Gensh K. V., Gensh T. S., Bazarnova N. G. Chiral supercritical fluid chromatography of 1,2-aminoalcohols (review). *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019;13(7):1095–1102. DOI: 10.1134/S1990793119070066.
6. Mikushina I. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Gensh K. V., Cheprasova M. Yu., Sysoeva A. V., Parenago O. O. Conditions for analytical chiral separation of 1-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)-2-((6-(1-methyl-3-phenylpropoxy)hexyl)amino)ethanol. Abstracts of the X Scientific-practical conference with international participation "Supercritical fluids: fundamentals, technologies, innovations". September 30 – October 06, 2019. Rostov-on-Don: Don; 2019. P. 135–137. (In Russ.)
7. Mikushina I. V., Bazarnova N. G., Parenago O. O., Gensh K. V., Cheprasova M. Yu. On the study of sorption during the chiral separation of enantiomers of salbutamol and salmeterol by supercritical fluid chromatography. *Zhurnal SFU. Himiya*. 2019;12(3):310–318. (In Russ.) DOI: 10.17516/1998-2836-0128.
8. Pokrovsky O. I., Parenago O. O., Lunin V. V. A method for the selective separation of a racemic mixture of salbutamol. Patent RUS № 2667002 C1. 13.09.2018. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2667002C1>. Accessed: 24.07.2020. (In Russ.)
9. Mikushina I. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Cheprasova M. Yu., Sysoeva A. V., Sysoev A. V., Kushnir E. Yu., Gensh K. V. The Development of a Method for the Preparative Separation of Salbutamol Enantiomers by Supercritical Fluid Chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020;14(7):1142–1147. DOI: 10.1134/S1990793120070143.
10. Roy D., Armstrong D. W. Fast super/subcritical fluid chromatographic enantioseparations on superficially porous particles bonded with broad selectivity chiral selectors relative to fully porous particles. *Journal of Chromatography A*. 2019;1605:360339. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.06.060.
11. Kostenko M. O., Pokrovsky O. I., Parenago O. O., Lunin V. V. Effect of the type and concentration of mobile phase additives on the separation of salbutamol sulfate enantiomers in supercritical fluid chromatography. *Vestnik Otdeleniya himicheskikh nauk Akademii nauk*. 2018;67(11):1997–2002. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11172-018-2320-3.
12. Wu S. G., Lin A. Y., Hsieh H. Y., Tsui H. W. Elucidation of adsorption mechanisms of solvent molecules with distinct functional groups on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based sorbent. *Journal of Chromatography A*. 2016;1460:123–134. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.024.
13. Berthod A. Chiral recognition in separation methods: mechanisms and applications. Heidelberg: Springer; 2010. 337 p.
14. Cardoso P. A., César I. C. Chiral method development strategies for HPLC using macrocyclic glycopeptide-based stationary phases. *Chromatographia*. 2018;81(6):841–850. DOI: 10.1007/s10337-018-3526-0.
15. Halabi A., Ferrayoli C., Palacio M., Dabbene V., Palacios S. Validation of a chiral HPLC assay for (R)-salbutamol sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(1):45–51. DOI: 10.1016/j.japna.2003.08.020.
16. Rosales-Conrado N., Dell'Aica M., de León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M. Determination of salbutamol by direct chiral reversed-phase HPLC using teicoplanin as stationary phase and its application to natural water analysis. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(11):1413–1422. DOI: 10.1002/bmc.2937.
17. Gazić I., Bosak A., Šinko G., Vinković V., Kovarić Z. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;385(8):1513–1519. DOI: 10.1007/s00216-006-0566-3.
18. Kostenko M. O., Ustinovich K. B., Pokrovskiy O. I., Bazarnova N. G., Lunin V. V. Effect of the Mobile Phase Composition on Selectivity in Supercritical Fluid Chromatography in the Separation of Salbutamol Enantiomers. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2018;12(7):1166–11751. DOI: 10.1134/S1990793118070059.
19. Ali H. S., York P., Blagden N., Khoubnasabjafari M., Acree Jr. W. E., Jouyban A. Solubility of salbutamol and salbutamol sulphate in ethanol + water mixtures at 25 °C. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;173:62–65. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.05.021.
20. Sysoev A. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Kushnir E. Yu., Gensh K. V., Cheprasova M. Yu., Mikushina I. V., Sysoeva A. V. Method of preparative separation racemic salbutamol base using supercritical fluid chromatography. Patent RUS № 2727890 C1. 03.10.2009. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2348455C2>. Accessed: 24.07.2020. (In Russ.)



## Фитохимическое изучение травы вербейника обыкновенного (*Lysimachia vulgaris* L.): выделение и установление структуры вторичных метаболитов

Е. М. Крипак, А. О. Понкратова<sup>✉</sup>, А. К. Уэйли, 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. 14, лит. А

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Понкратова Анастасия Олеговна. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: Е. М. Крипак – <https://orcid.org/0000-0002-3551-5632>; А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Е. В. Жохова – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>.

Статья поступила: 06.09.2022      Статья принята в печать: 21.10.2022      Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Природные объекты, в особенности растительные, на протяжении многих веков применяются в народной медицине различных стран и являются богатыми источниками природных соединений. Одним из растений, представляющих интерес для изучения, является вербейник обыкновенный (*Lysimachia vulgaris* L.), сведения о химическом составе которого немногочисленны.

**Цель.** Провести фитохимическое изучение травы *L. vulgaris*, путем выделения вторичных метаболитов в индивидуальном виде и установления их структуры.

**Материалы и методы.** Надземные части вербейника обыкновенного, собранные на территории Ленинградской области (Всеволожский район, пос. им. Морозова, берег Ладожского озера) в июле 2021 году. Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором. Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках заполненных сорбентом Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония), а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором. Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

**Результаты и обсуждение.** В результате фитохимического изучения травы *L. vulgaris* были выделены и установлены структуры семи индивидуальных соединений (1–7). Соединение 1 и 2 представляют собой лютеолин и кверцетин, соответственно, в то время как соединения 3–7 представляют собой гликозиды кверцетина, мирицита и кемпферола, а именно мирицетин-3-O-β-D-рутинозид (3), мирицетин-3-O-β-D-глюкопиранозид (4), кверцетин-3-O-β-D-рутинозид (рутин) (5), кверцетин-3-O-β-D-глюкопиранозид (6), кемпферол-3-O-β-D-рутинозид (7).

**Заключение.** В результате проведенного фитохимического изучения травы *L. vulgaris* было выделено семь индивидуальных соединений. Соединение 1 и 4 обнаружены в траве *L. vulgaris* впервые, а также все соединения (1–7), впервые выделены из травы вербейника обыкновенного.

**Ключевые слова:** *Lysimachia vulgaris*, вербейник обыкновенный, флавоноиды, вторичные метаболиты

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

**Вклад авторов.** Е. М. Крипак, А. О. Понкратова и А. К. Уэйли выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. А. О. Понкратова и Е. В. Жохова подготовили текст рукописи. Е. В. Жохова осуществляла руководство научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

**Для цитирования:** Крипак Е. М., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Жохова Е. В. Фитохимическое изучение травы вербейника обыкновенного (*Lysimachia vulgaris* L.): выделение и установление структуры вторичных метаболитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):170–176. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-170-176>

## Phytochemical Analysis of *Lysimachia vulgaris* L. Aerial Part: Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites

Ekaterina M. Kripak, Anastasiia O. Ponkratova<sup>✉</sup>, Andrei K. Whaley, Elena V. Zhokhova

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Anastasiia O. Ponkratova. E-mail: anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: Ekaterina M. Kripak – <https://orcid.org/0000-0002-3551-5632>; Anastasiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Elena V. Zhokhova – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>.

Received: 06.09.2022      Revised: 21.10.2022      Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** Natural sources, especially plants, have been used in folk medicine of various countries for many centuries and appears as rich sources of natural compounds. One of the interesting plants for study is the yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* L.), the information on the chemical composition of which is scarce.

**Aim.** Carry out a phytochemical research of the *L. vulgaris* aerial part, by isolation of individual secondary metabolites and elucidation of their structure.

**Material and methods.** Aerial part of *L. vulgaris*, was collected in the Leningrad region (Vsevolozhsk district, Morozov village, the shore of Lake Ladoga) in July 2021. Fraction analysis was performed through analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) using a LC-20 Prominence (Shimadzu corp., Japan) equipped with a SPD-M20A diode-array detector. The isolation of compounds was carried out by open column chromatography using sorbent Dianion HP-20, as well as by preparative HPLC using a Smartline system (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structures of the isolated compounds were established by NMR experiments (Bruker Avance III 400 MHz, Germany).

**Results and discussion.** As a result of *L. vulgaris* aerial part phytochemical research, the structures of seven individual compounds (1–7) were elucidated. Compounds 1 and 2 are luteolin and quercetin, respectively, while compounds 3–7 are glycosides of quercetin, myricitin and kaempferol, namely myricetin-3-O-β-D-rutinoside (3), myricetin-3-O-β-D-glucopyranoside (4), quercetin-3-O-β-D-rutinoside (rutin) (5), quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (6), kaempferol-3-O-β-D-rutinoside (7).

**Conclusion.** As a result of *L. vulgaris* aerial part phytochemical research, seven individual compounds were isolated. Compounds 1 and 4 have been found in the aerial part of *L. vulgaris* for the first time, and all compounds (1–7) have been isolated for the first time from the yellow loosestrife herb.

**Keywords:** *Lysimachia vulgaris*, yellow loosestrife, flavonoids, secondary metabolites

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

**Contribution of the authors.** Ekaterina M. Kripak, Anastasiia O. Ponkratova and Andrei K. Whaley performed the experimental part and processing of the results. Anastasiia O. Ponkratova and Elena V. Zhokhova took part in preparing of the article text. Elena V. Zhokhova supervised the research. All authors took part in the discussion of the results.

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

**For citation:** Kripak E. M., Ponkratova A. O., Whaley A. K., Zhokhova E. V. Phytochemical analysis of *Lysimachia vulgaris* L. aerial part: isolation and structure elucidation of secondary metabolites. *Drug development & registration*. 2022;11(4):170–176. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-170-176>

## ВВЕДЕНИЕ

Природные объекты, в особенности растительные, на протяжении многих веков применяются в народной медицине различных стран и являются богатыми источниками природных соединений, нашедшее широкое применение в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности [1–8]. Однако химический состав некоторых растений исследован незначительно или не изучен вовсе [9]. Одним из таких растений является вербейник обыкновенный (*Lysimachia vulgaris* L.) представляющий собой многолетнее травянистое растение из семейства *Primulaceae*. *L. vulgaris* распространен на территории Северной Америки, стран Азии, Европы и на территории России. Типичным местом обитания данного вида являются влажные луга, сырьи леса, берега водоемов и болота [10, 11].

*L. vulgaris* широко применяется в народной медицине для лечения диареи, наружных и внутренних кровотечений и для очистки ран, а также в качестве отхаркивающего, вяжущего, жаропонижающего, анальгезирующего, противовоспалительного и ранозаживляющего средств [12–16]. Также, в ряде

исследований была установлена активность вербейника обыкновенного при неалкогольном стеатогепатите [10].

В ряде проведенных исследований сообщается о содержании в вербейнике обыкновенном бензохинонов, сапонинов, флавоноидов, гидроксикоричных кислот и танинов [17–22]. Однако сведения о химическом составе *L. vulgaris* немногочисленны, а также, в ранее проведенных исследованиях, изучение химического состава флавоноидов в *L. vulgaris* проводилось только при помощи ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС методов.

Таким образом, **целью настоящего исследования** является фитохимическое изучение травы *Lysimachia vulgaris*, путем выделения вторичных метаболитов в индивидуальном виде и установления их структуры при помощи современных физико-химических методов анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Надземные части вербейника обыкновенного (олиственные цветоносные побеги длиной до 30 см) были собраны в период цветения на территории Ленинградской области (Всеволожский район,

пос. им. Морозова, берег Ладожского озера) в июле 2021 году, высушены воздушно-теневым способом, измельчены и просеяны. Для перемешивания экстракта использовалась механическая мешалка RZR 2021 (Heidolph, Германия). Для выпаривания экстрактов и фракций использовался вакуумно-ротационный испаритель Hei-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия).

Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором, при 235 и 254 нм. Применялась хроматографическая колонка SUPELCOSIL™ LC-18 (25 см × 4,6 мм) с размером частиц 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура анализа – 40 °С. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1 % [с H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (5:95) до H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (0:100, по объему)]. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) выполнялась на приборе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин для ВЭТСХ HPTLC Silica gel 60 F 254 plate (Merck KGaA, Германия) (4–8 μm).

Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках заполненных сорбентом Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония), а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенным спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Применялась препаративная хроматографическая колонка Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5 мкм). Скорость потока элюента 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1 % [с H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (5:95) до H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (50:50), по объему].

Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В результате фитохимического изучения травы *Lysimachia vulgaris* были выделены и установлены структуры семи индивидуальных соединений (**1–7**), относящихся к классу флавоноидов, а также их гликозиды (рисунок 1).

Перед экстракцией сырье подвергалось воздушно-теневой сушке, измельчалось и просеивалось через сито, с диаметром отверстий 1 мм. К 300 грамм измельченного сырья добавляли десятикратный объем (3000 мл) 96 % этилового спирта (EtOH), и проводили многократную экстракцию методом мацерации. Экстракция проводилась при комнатной температуре до того момента, пока полученный экстракт не становился бледным, по сравнению с первоначальным. Все полученные спиртовые экстракты объединялись и выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C до объема 300 мл. К 300 мл экстракта добавляли 100 мл воды очищенной и проводили многократную исчерпывающую жидкостно-жидкостную (ЖЖ) экстракцию с 400 мл *n*-гексана. После чего к спирто-водному остатку добавляли еще 100 мл воды очищенной и проводили многократную исчерпывающую экстракцию с 400 мл дихлорметана. В заключении проводили ЖЖ экстракцию с 400 мл бутанола.

Бутанольную фракцию выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C до объема 50 мл, после чего загружали на открытую стеклянную колонку, заполненную сорбентом Dianion® HP-20. Проводили градиентное элюирование с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10 % [с H<sub>2</sub>O:96 % EtOH (100:0) до H<sub>2</sub>O:96 % EtOH (0:100), по объему]. Собранные фракции анализировались методом ТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которые имели пятна с одинаковыми факторами удерживания (R<sub>f</sub>) и окраской, – объединялись. Объединенные фракции выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C до объема 10 мл. Таким образом было получено 11 фракций. Фракцию № 2 и № 6 под-

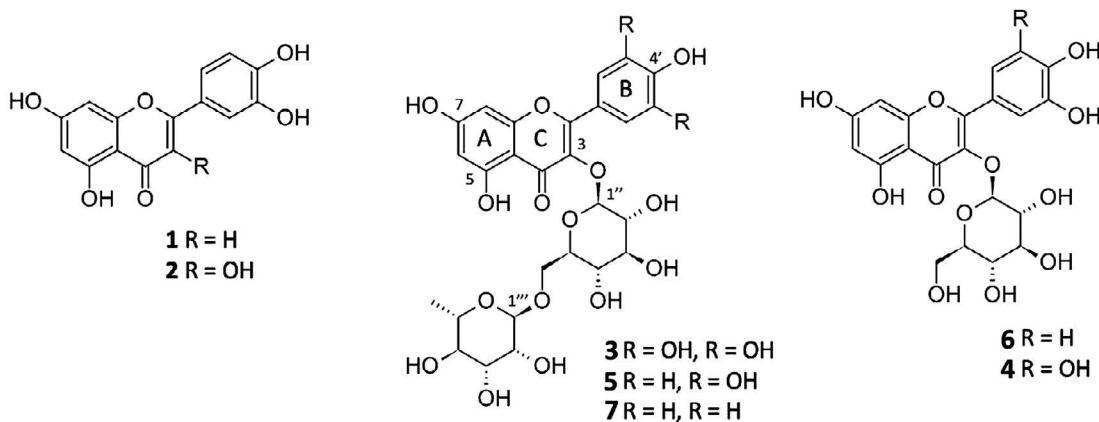


Рисунок 1. Структуры соединений 1–7

Figure 1. Structure of compounds 1–7

вергалась хроматографическому разделению на препаративном высокоеффективном жидкостном хроматографе, в результате чего были выделены: соединение **1** ( $m = 9,71$  мг,  $t_R = 23,899$  мин); соединение **2** ( $m = 10,12$  мг,  $t_R = 23,948$  мин); соединение **3** ( $m = 8,43$  мг,  $t_R = 18,025$  мин); соединение **4** ( $m = 9,36$  мг,  $t_R = 18,318$  мин); соединение **5** ( $m = 15,01$  мг,  $t_R = 19,080$  мин); соединение **6** ( $m = 12,52$  мг,  $t_R = 19,588$  мин); соединение **7** ( $m = 6,91$  мг,  $t_R = 20,088$  мин).

Соединение **1** представляет собой желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при 251 и 347 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре соединения наблюдались сигналы протонов характерные для флавонов. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.20 (1Н, уш. с, Н-6) и 6.45 (1Н, уш. с, Н-8), кольца В при  $\delta\text{H}$  7.40 (1Н, уш. с, Н-2'), 6.90 (1Н, д,  $J = 8.1$  Гц, Н-5') и 7.41 (1Н, м, Н-6') и кольца С при  $\delta\text{H}$  6.67 (1Н, с, Н-3). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.97 (1Н, с, 5-OH), 10.83 (1Н, уш. с, 7-OH), 9.87 (1Н, уш. с, 4'-OH) и 9.41 (1Н, уш. с, 3'-OH). Таким образом, в результате анализа ЯМР-спектров и литературных данных [23], соединение **1** было идентифицировано как лютеолин.

Соединение **2** – желто-зеленое кристаллическое вещество, имеющее максимумы УФ-поглощения при 252 и 367 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре соединения **2** наблюдались сигналы протонов характерные для флавонолов. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.20 (1Н, д,  $J = 2.0$  Гц, Н-6) и 6.41 (1Н, д,  $J = 2.0$  Гц, Н-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.68 (1Н, д,  $J = 2.1$  Гц, Н-2'), 6.89 (1Н, д,  $J = 8.4$  Гц, Н-5') и 7.54 (1Н, дд,  $J = 8.4$ , 2.1 Гц, Н-6'). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.49 (1Н, с, 5-OH), 10.83 (1Н, уш. с, 7-OH), 9.87 (1Н, уш. с, 4'-OH) и 9.41 (1Н, уш. с, 3'-OH). В результате анализа ЯМР-данных и данных литературы [24] соединение **2** было идентифицировано как кверцетин.

Соединение **3** – желтое кристаллическое вещество, имеющее максимум УФ-поглощения при 255 и 356 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре соединения наблюдались сигналы протонов характерные для мирицетина и остатка рутинозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.19 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-6) и 6.36 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.17 (2Н, с, Н-2',6'). В алифатической области спектра наблюдаются сигналы аномерных протонов при  $\delta\text{H}$  5.40 (1Н, д,  $J = 7.7$  Гц, Н-1") и 4.40 (1Н, уш. с, Н-1"), протонов гидроксиметильной группы и метильной группы при  $\delta\text{H}$  3.74 (1Н, д,  $J = 10.5$  Гц, Н-6b") и 1.00 (3Н, д,  $J = 6.2$  Гц, Н-6'") а также остальных протонов остатков глюкозы и рамнозы в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.0–3.40 (9Н, м). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.63 (1Н, с, 5-OH), 10.81 (1Н, уш. с, 7-OH), 9.11 (2Н, уш. с, 3', 5'-OH) и 8.87 (1Н, уш. с, 4'-OH). В результате анализа ЯМР-спектров и сравнения с литературными данными [25], соединение **3** было идентифицировано как мирицетин-3-O-рутинозид.

Соединение **4** представляет собой желтое кристаллическое вещество, с максимумами поглощения в УФ-спектре при 254 и 355 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре соединения **4** наблюдались сигналы протонов характерные для мирицетина и остатка глюкозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.19 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-6) и 6.36 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.20 (2Н, с, Н-2',6'). В алифатической области спектра наблюдаются сигнал аномерного протона при  $\delta\text{H}$  5.40 (1Н, д,  $J = 7.6$  Гц, Н-1"), протонов гидроксиметильной группы при  $\delta\text{H}$  3.61 (1Н, д,  $J = 10.9$  Гц, Н-6b"), а также остальных протонов остатков глюкозы в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.0–3.40 (5Н, м). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.65 (1Н, с, 5-OH), 10.85 (1Н, с, 7-OH), 9.14 (2Н, уш. с, 3', 5'-OH) и 8.84 (1Н, уш. с, 4'-OH). Таким образом, в результате анализа данных ЯМР и литературных данных [26], соединение **4** идентифицировано как мирицетин-3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

Данные ЯМР-спектров соединений **1–4** представлены в таблице 1.

Соединение **5** представляет собой желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при 255 и 351 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре соединения наблюдались сигналы протонов характерные для кверцетина и остатка рутинозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.20 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-6) и 6.40 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.54 (1Н, м, Н-2'), 6.85 (1Н, д,  $J = 8.6$  Гц, Н-5') и 7.54 (1Н, м, Н-6'). В алифатической области спектра наблюдаются сигналы аномерных протонов при  $\delta\text{H}$  5.35 (1Н, д,  $J = 7.2$  Гц, Н-1") и 4.40 (1Н, уш. с, Н-1"), протонов гидроксиметильной группы и метильной группы при  $\delta\text{H}$  3.72 (1Н, д,  $J = 10.4$  Гц, Н-6b") и 1.00 (3Н, д,  $J = 6.2$  Гц, Н-6'"), а также остальных протонов остатков глюкозы и рамнозы в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.0–3.43 (9Н, м). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.60 (1Н, с, 5-OH), 10.83 (1Н, уш. с, 7-OH), 9.65 (1Н, уш. с, 4'-OH) и 9.16 (1Н, уш. с, 3'-OH). В результате анализа ЯМР-спектров и литературных данных [24], соединение **5** идентифицировано как рутин.

Соединение **6** – желто-зеленое кристаллическое вещество, имеющее максимумы УФ-поглощения при 255 и 351 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре наблюдались сигналы протонов характерные для кверцетина и остатка глюкозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.19 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-6) и 6.36 (1Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.58 (1Н, м, Н-2'), 6.85 (1Н, д,  $J = 9.0$  Гц, Н-5') и 7.58 (1Н, м, Н-6'). В алифатической области спектра наблюдаются сигналы аномерного протона при  $\delta\text{H}$  5.47 (1Н, д,  $J = 7.0$  Гц, Н-1"), протонов гидроксиметильной группы при  $\delta\text{H}$  3.59 (1Н, д,  $J = 7.0$  Гц, Н-6b") и 1.00 (3Н, д,  $J = 6.2$  Гц, Н-6'") а также остальных протонов остатка глюкозы в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.0–3.38 (5Н, м). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.64 (1Н, с, 5-OH), 10.86 (1Н, с, 7-OH), 9.70 (1Н, уш. с, 4'-OH) и 9.20 (1Н, уш. с, 3'-OH). В результате анализа ЯМР-спектров и сравнения их с литератур-

**Таблица 1.** Данные ЯМР соединений 1–4

**Table 1.** NMR data of compounds 1–4

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2	Соединение 3 Compound 3	Соединение 4 Compound 4
	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)
3	6.67 (1H, с) 6.67 (1H, s)	—	—	—
6	6.20 (1H, уш. с) 6.20 (1H, brs)	6.19 (1H, д, J = 2.0 Гц) 6.19 (1H, d, J = 2.0 Hz)	6.19 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.19 (1H, d, J = 1.9 Hz)	6.19 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.19 (1H, d, J = 1.9 Hz)
8	6.45 (1H, уш. с) 6.45 (1H, brs)	6.41 (1H, д, J = 2.0 Гц) 6.41 (1H, d, J = 2.0 Hz)	6.36 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.36 (1H, d, J = 1.9 Hz)	6.36 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.36 (1H, d, J = 1.9 Hz)
2'	7.40 (1H, уш. с) 7.40 (1H, brs)	7.68 (1H, д, J = 2.1 Гц) 7.68 (1H, d, J = 2.1 Hz)	7.17 (2H, с) 7.17 (2H, s)	7.20 (2H, с) 7.20 (2H, s)
5'	6.90 (1H, д, J = 8.1 Гц) 6.90 (1H, d, J = 8.1 Hz)	6.89 (1H, д, J = 8.4 Гц) 6.89 (1H, d, J = 8.4 Hz)	—	—
6'	7.41 (1H, м) 7.41 (1H, m)	7.54 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Гц) 7.54 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz)	7.17 (2H, с) 7.17 (2H, s)	7.20 (2H, с) 7.20 (2H, s)
5-ОН	12.97 (1H, с) 12.97 (1H, s)	12.49 (1H, с) 12.49 (1H, s)	12.63 (1H, с) 12.63 (1H, s)	12.65 (1H, с) 12.65 (1H, s)
7-ОН	10.83 (1H, уш. с) 10.83 (1H, brs)	10.78 (1H, с) 10.78 (1H, s)	10.81 (1H, с) 10.81 (1H, s)	10.85 (1H, с) 10.85 (1H, s)
3'-ОН	9.41 (1H, уш. с) 9.41 (1H, brs)	9.28 (1H, уш. с) 9.28 (1H, brs)	9.11 (1H, с) 9.11 (1H, s)	9.14 (1H, уш. с) 9.14 (1H, brs)
4'-ОН	9.87 (1H, уш. с) 9.87 (1H, brs)	9.57 (1H, уш. с) 9.57 (1H, brs)	8.87 (1H, с) 8.87 (1H, s)	8.84 (1H, уш. с) 8.84 (1H, brs)
5'-ОН	—	—	9.11 (1H, с) 9.11 (1H, s)	9.14 (1H, уш. с) 9.14 (1H, brs)
1''	—	—	5.40 (1H, д, J = 7.7 Гц) 5.40 (1H, d, J = 7.7 Hz)	5.40 (1H, д, J = 7.6 Гц) 5.40 (1H, d, J = 7.6 Hz)
2''–6а''	—	—	3.00–3.40 (5H, м) 3.00–3.40 (5H, m)	3.00–3.40 (5H, м) 3.00–3.40 (5H, m)
6б''	—	—	3.74 (1H, д, J = 10.5 Гц) 3.74 (1H, d, J = 10.5 Hz)	3.61 (1H, д, J = 10.9 Гц) 3.61 (1H, d, J = 10.9 Hz)
1'''	—	—	4.40 (1H, уш. с) 4.40 (1H, brs)	—
2'''–5'''	—	—	3.00–3.40 (4H, м) 3.00–3.40 (4H, m)	—
6'''	—	—	1.00 (3H, д, J = 6.2 Гц) 1.00 (3H, d, J = 6.2 Hz)	—

ными данными [26], соединение **6** было идентифицировано как кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид.

Соединение **7** представляет собой желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при 265 и 347 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре наблюдались сигналы протонов характерные для кемпферола и остатка рутинозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta$ H 6.21 (1H, д, J = 2.0 Гц, H-6) и 6.42 (1H, д, J = 2.0 Гц, H-8) и кольца В при  $\delta$ H 7.99 (2H, д, J = 8.9 Гц, H-2', 6') и 6.88 (2H, д, J = 8.9 Гц, H-3', 5'). В алифатической области спектра наблюдаются сигналы аномерных протонов при  $\delta$ H 5.32 (1H, д, J = 7.2 Гц, H-1'') и 4.39 (1H, уш. с, H-1'''), протонов гидроксиметильной группы и метильной группы при  $\delta$ H 3.70 (1H, д, J = 9.7 Гц, H-6b'') и 1.00 (3H, д, J = 6.2 Гц, H-6''), а также остальных протонов остатков глюказы и рамнозы в диапазоне  $\delta$ H 3.0–3.43 (9H, м). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta$ H 12.57 (1H, с, 5-ОН), 10.85 (1H, уш. с, 7-ОН) и 10.12 (1H, уш. с,

4'-ОН). В результате анализа ЯМР-данных и данных литературы [27], соединение **7** идентифицировано как кемпферол-3-О-рутинозид (никотифлорин).

Данные ЯМР-спектров соединений **5–7** приведены в таблице 2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования был изучен химический состав вторичных метаболитов, содержащихся в траве *Lysimachia vulgaris*, выделены и охарактеризованы структуры семи индивидуальных соединений, относящихся к классам флавоноидов. Согласно данным  $^1\text{H}$  ЯМР-спектров, а также в результате сравнения их с литературными данными, было установлено, что соединение **1** и **2** представляют собой агликоны флавоноидов, а именно лютеолин и кверцетин, соответственно. Соединения **3–7** представляют собой гликозиды кверцетина, мирицитина и кемпферола, а именно мирицитин-3-О-β-D-рутинозид (**3**), мирицитин-3-О-β-D-глюкопирано-

**Таблица 2.** Данные ЯМР соединений 5–7

**Table 2.** NMR data of compounds 5–7

Положение Position	Соединение 5 Compound 5	Соединение 6 Compound 6	Соединение 7 Compound 7
	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (J в Гц) $\delta$ H (J, Hz)
6	6.20 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.20 (1H, d, J = 1.9 Hz)	6.19 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.19 (1H, d, J = 1.9 Hz)	6.21 (1H, д, J = 2.0 Гц) 6.21 (1H, d, J = 2.0 Hz)
8	6.40 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.40 (1H, d, J = 1.9 Hz)	6.36 (1H, д, J = 1.9 Гц) 6.36 (1H, d, J = 1.9 Hz)	6.42 (1H, д, J = 2.0 Гц) 6.42 (1H, d, J = 2.0 Hz)
2'	7.54 (1H, м) 7.54 (1H, m)	7.58 (1H, м) 7.58 (1H, m)	7.99 (1H, д, J = 8.9 Гц) 7.99 (1H, d, J = 8.9 Hz)
3'	–	–	6.88 (1H, д, J = 8.9 Гц) 6.88 (1H, d, J = 8.9 Hz)
5'	6.85 (1H, д, J = 8.6 Гц) 6.85 (1H, d, J = 8.6 Hz)	6.85 (1H, д, J = 9.0 Гц) 6.85 (1H, d, J = 9.0 Hz)	6.88 (1H, д, J = 8.9 Гц) 6.88 (1H, d, J = 8.9 Hz)
6'	7.55 (1H, м) 7.55 (1H, m)	7.58 (1H, м) 7.58 (1H, m)	7.99 (1H, д, J = 8.9 Гц) 7.99 (1H, d, J = 8.9 Hz)
1''	5.35 (1H, д, J = 7.2 Гц) 5.35 (1H, d, J = 7.2 Hz)	5.47 (1H, д, J = 7.0 Гц) 5.47 (1H, d, J = 7.0 Hz)	5.32 (1H, д, J = 7.2 Гц) 5.32 (1H, d, J = 7.2 Hz)
2''–6a''	3.00–3.43 (5H, м) 3.00–3.43 (5H, m)	3.00–3.38 (5H, м) 3.00–3.38 (5H, m)	3.00–3.43 (5H, м) 3.00–3.43 (5H, m)
6b''	3.72 (1H, д, J = 10.4 Гц) 3.72 (1H, d, J = 10.4 Hz)	3.59 (1H, д, J = 11.3 Гц) 3.59 (1H, d, J = 11.3 Hz)	3.70 (1H, д, J = 9.7 Гц) 3.70 (1H, d, J = 9.7 Hz)
1'''	4.40 (1H, уш. с) 4.40 (1H, brs)	–	4.39 (1H, уш. с) 4.39 (1H, brs)
2'''–5'''	3.00–3.43 (4H, м) 3.00–3.43 (4H, m)	–	3.00–3.43 (4H, м) 3.00–3.43 (4H, m)
6'''	1.00 (3H, д, J = 6.2 Гц) 1.00 (3H, d, J = 6.2 Hz)	–	0.99 (3H, д, J = 6.2 Гц) 0.99 (3H, d, J = 6.2 Hz)
5-OH	12.60 (1H, с) 12.60 (1H, s)	12.64 (1H, с) 12.64 (1H, s)	12.57 (1H, с) 12.57 (1H, s)
7-OH	10.83 (1H, с) 10.83 (1H, s)	10.86 (1H, с) 10.86 (1H, s)	10.85 (1H, уш. с) 10.85 (1H, brs)
3'-ОН	9.65 (1H, с) 9.65 (1H, s)	9.70 (1H, уш. с) 9.70 (1H, brs)	–
4'-ОН	9.16 (1H, с) 9.16 (1H, s)	9.20 (1H, уш. с) 9.20 (1H, brs)	10.12 (1H, уш. с) 10.12 (1H, brs)

зид (**4**), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-рутинозид (рутин) (**5**), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид (**6**), кемпферол-3-O- $\beta$ -D-рутинозид (никотифлорин) (**7**). Соединение **1** и **4** обнаружены в траве *L. vulgaris* впервые, а также все соединения (**1**–**7**), впервые выделены из травы вербейника обыкновенного.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bernardini S., Tiezzi A., Laghezza Masci V., Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*. 2018;32(16):1926–1950.
- Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Новикова В. В., Безверхняя Е. А. Противомикробная активность соединений полифенольной природы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):65–72.
- Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбарян С. П., Повыдыsh M. H. Выделение формононетин-7-O- $\beta$ -D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):14–19.
- Peddoju A., Singh S., Mca S. Review: Medicinal Plant use for the treatment of Diabetes. *SSRN*. 2019;6(2):968–975.
- Salleh N. H., Zulkipli I. N., Yasin H. M., Jaafar F., Ahmad N., Ahmad W. A. N. W., Ahmad S. R. Systematic review of medicinal plants used for treatment of diabetes in human clinical trials: an ASEAN perspective. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2021;2021:1–10.
- Pranskuniene Z., Balciunaite R., Simaitiene Z., Bernatoniene J. Herbal medicine uses for respiratory system disorders and possible trends in new herbal medicinal recipes during COVID-19 in pasvalys district, Lithuania. *Environmental research and public health*. 2022;9:8905.
- Ray S., Saini M. K. Cure and prevention of cardiovascular diseases: herbs for heart. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:64.
- Singh S., Singh T. G., Mahajan K., Dhiman S. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72(10):1306–1327.
- Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 1985;228:1154–1160.
- Yang-Ju S., Jung D. S., Shin J. M., Kim M., Yoo G., Nho C. W. Yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* var. *davurica*) ameliorates liver fibrosis in db/db mice with methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21(1):44.
- Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование; семейства *Paeoniaceae* – *Thymelaeaceae*. Л.: Наука; 1985. 36 с.

12. Chevallier A. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. London: Darling Kindersley Limited; 1996. 336 p.
  13. Grieve M. *A modern herbal*. Vol. 2. New York: Dover Publications; 1982. 544 p.
  14. Dobelis I. N. *Magic and Medicine of Plants*. New York: The Reader's Digest Association; 1989.
  15. Baytop T. *Türkiye'de bitkiler ile tedavi*. İstanbul: Nobel Tip Kitabevleri; 1999. 480 p. (In Turk.)
  16. Yildirim A. B., Guner, B., Karakas, F. P., Turker, A. U. Evaluation of antibacterial, antitumor, antioxidant activities and phenolic constituents of field-grown and *in vitro*-grown *Lysimachia vulgaris* L. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. 2017;14(2):177–187.
  17. Rzadkowskabodalska H., Olechnowiczstepien W. Flavonoids in herb of yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* L.). *Polish journal of pharmacology and pharmacy*. 1975;27(3):345–348.
  18. Yasukawa K., Takido M. Studies of the constituents of genus *Lysimachia* 3. Quercetin 3-Rhamnosyl (1-2) galactoside from *Lysimachia vulgaris* var. *davurica*. *Phytochemistry*. 1988;27(9):3017–3018.
  19. Janik I., Janeczko Z., Sendra J., Burczyk J. Benzoquinone pigment from *Lysimachia vulgaris*. *Fitoterapia*. 1994;65(5):476.
  20. Podolak I., Elas M., Cieszka K. In vitro antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research*. 1998;12:70–73.
  21. Toth A., Riethmüller E., Alberti A., Végh K., Kery A. Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *European Chemical Bulletin*. 2012;1(1–2):27–30.
  22. Toth A., Toth G., Kery A. Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural Product Communications*. 2014;9:1473–1478.
  23. Lin L. C., Pai Y. F., Tsai T. H. Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(35):7700–7706.
  24. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стольника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
  25. Bilia A. R., Mendez J., Morelli I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 1996;71(3):191–197.
  26. Топоркова В. И., Понкратова А. О., Лужанин В. Г., Гончаров М. Ю. Применение спектральных методов анализа для установления структуры индивидуальных вторичных метаболитов, выделенных из надземной части хохлатки крупноприцветниковой. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2022;12(1):56–64.
  27. Akkol E. K., Süntar I., Keles H., Sezik E., Gürler G. Bioassay-guided isolation and characterization of wound healer compounds from *Morus nigra* L. (Moraceae). *Records of Natural Products*. 2015;9(4):484–495.
- ASEAN perspective. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2021;2021:1–10.
6. Pranskuniene Z., Balciunaite R., Simaitiene Z., Bernatoniene J. Herbal medicine uses for respiratory system disorders and possible trends in new herbal medicinal recipes during COVID-19 in pasvalys district, Lithuania. *Environmental research and public health*. 2022;9:8905.
  7. Ray S., Saini M. K. Cure and prevention of cardiovascular diseases: herbs for heart. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:64.
  8. Singh S., Singh T. G., Mahajan K., Dhiman S. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72(10):1306–1327.
  9. Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 1985;228:1154–1160.
  10. Yang-Ju S., Jung D. S., Shin J. M., Kim M., Yoo G., Nho C. W. Yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* var. *davurica*) ameliorates liver fibrosis in db/db mice with methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21(1):44.
  11. Plant resources of the USSR: flowering plants, their chemical composition, use; families *Paeoniaceae – Thymelaeaceae*. Leningrad: Nauka; 1985. 36 p. (In Russ.)
  12. Chevallier A. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. London: Darling Kindersley Limited; 1996. 336 p.
  13. Grieve M. *A modern herbal*. Vol. 2. New York: Dover Publications; 1982. 544 p.
  14. Dobellis I. N. *Magic and Medicine of Plants*. New York: The Reader's Digest Association; 1989.
  15. Baytop T. *Türkiye'de bitkiler ile tedavi*. İstanbul: Nobel Tip Kitabevleri; 1999. 480 p. (In Turk.)
  16. Yildirim A. B., Guner, B., Karakas, F. P., Turker, A. U. Evaluation of antibacterial, antitumor, antioxidant activities and phenolic constituents of field-grown and *in vitro*-grown *Lysimachia vulgaris* L. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. 2017;14(2):177–187.
  17. Rzadkowskabodalska H., Olechnowiczstepien W. Flavonoids in herb of yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* L.). *Polish journal of pharmacology and pharmacy*. 1975;27(3):345–348.
  18. Yasukawa K., Takido M. Studies of the constituents of genus *Lysimachia* 3. Quercetin 3-Rhamnosyl (1-2) galactoside from *Lysimachia vulgaris* var. *davurica*. *Phytochemistry*. 1988;27(9):3017–3018.
  19. Janik I., Janeczko Z., Sendra J., Burczyk J. Benzoquinone pigment from *Lysimachia vulgaris*. *Fitoterapia*. 1994;65(5):476.
  20. Podolak I., Elas M., Cieszka K. In vitro antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research*. 1998;12:70–73.
  21. Toth A., Riethmüller E., Alberti A., Végh K., Kery A. Comparative phytochemical screening of phenoloids in *Lysimachia* species. *European Chemical Bulletin*. 2012;1(1–2):27–30.
  22. Toth A., Toth G., Kery A. Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural Product Communications*. 2014;9:1473–1478.
  23. Lin L. C., Pai Y. F., Tsai T. H. Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(35):7700–7706.
  24. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of individual compounds from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. and *Solidago canadensis* L. *Drug development & registration*. 2021;10(1):83–89. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
  25. Bilia A. R., Mendez J., Morelli I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 1996;71(3):191–197.
  26. Toporkova V. I., Ponkratova A. O., Whaley A. K., Luzhanin V. G., Goncharov M. Yu. The use of spectroscopic methods for structural elucidation of individual secondary metabolites isolated from the aerial parts of *Corydalis bracteata*. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(1):56–64. (In Russ.)
  27. Akkol E. K., Süntar I., Keles H., Sezik E., Gürler G. Bioassay-guided isolation and characterization of wound healer compounds from *Morus nigra* L. (Moraceae). *Records of Natural Products*. 2015;9(4):484–495.

## REFERENCES

1. Bernardini S., Tiezzi A., Laghezza Masci V., Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*. 2018;32(16):1926–1950.
2. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Novikova V. V., Bezverkhniaia E. A. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds. *Drug development & registration*. 2022;11(2):65–72. (In Russ.)
3. Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharo M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullayeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydsh M. N. Isolation of formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):14–19. (In Russ.)
4. Peddoju A., Singh S., Mca S. Review: Medicinal Plant use for the treatment of Diabetes. *SSRN*. 2019;6(2):968–975.
5. Salleh N. H., Zulkipli I. N., Yasin H. M., Jaafar F., Ahmad N., Ahmad W. A. N. W., Ahmad S. R. Systematic review of medicinal plants used for treatment of diabetes in human clinical trials: an

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184>  
УДК 54.061:54.062:615.322



Оригинальная статья / Research article

## Выделение индивидуальных соединений из травы сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) и установление их структуры спектроскопическими методами

Й. Стругар<sup>✉</sup>, А. А. Орлова, А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, М. Н. Повыдыш

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Стругар Йована. E-mail: jovana.strugar12@gmail.com

ORCID: Й. Стругар – <https://orcid.org/0000-0002-0816-257>; А. А. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-7836-5785>; А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; М. Н. Повыдыш – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 21.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Лекарственные растения представляют собой богатый, практически неиссякаемый источник лекарственных веществ, их исследование является всегда актуальной задачей в силу большого химического разнообразия метаболитов доступных для выделения и последующего скрининга их биологической активности. Одним из перспективных лекарственных растений для исследований является сабельник болотный (*Comarum palustre* L.), широко применяемый в народной медицине для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата.

**Цель.** Выделение индивидуальных вторичных метаболитов из травы *C. palustre* с последующим установлением их структуры методом ЯМР-спектроскопии.

**Материалы и методы.** Надземная часть сабельника болотного, заготовленная июле 2021 года в окрестностях питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км). Анализ фракций проводили методом аналитической высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором. Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективностью, а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором. Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами 1D ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

**Результаты и обсуждение.** Были выделены и охарактеризованы структуры семи (1–7) индивидуальных соединений. Два соединения (1 и 2) являются производными эллаговой кислоты, а именно: 4-O- $\alpha$ -L-арабинофуранозид эллаговой кислота (1) 4-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид эллаговой кислоты (2), и пять соединений являются производными флавоноидов: кемпферол-3-O- $\beta$ -D-глюкуронид (3), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-глюкуронид (4), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-(6''- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глюкопиранозид (5), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-(2''-галлоил)-глюкопиранозид (6) и (+)-кэтехин (7).

**Заключение.** В результате исследования из надземной части сабельника болотного были выделены и установлены структуры семи индивидуальных соединений. Соединения 1, 2, 4, 5 и 6 обнаружены и выделены из надземной части *C. palustre* L. впервые.

**Ключевые слова:** *Comarum palustre*, сабельник болотный, вторичные метаболиты, полифенолы, флавоноиды

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

**Вклад авторов.** Й. Стругар, А. А. Орлова, А. О. Понкратова, А. К. Уэйли выполняли экспериментальную часть работы и интерпретировали результаты. Й. Стругар, А. О. Понкратова, М. Н. Повыдыш подготовили текст рукописи. М. Н. Повыдыш осуществляла руководство научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

**Для цитирования:** Стругар Й., Орлова А. А., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Повыдыш М. Н. Выделение индивидуальных соединений из травы сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) и установление их структуры спектроскопическими методами. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):177–184. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184>

## Isolation of Individual Compounds from the Aerial Part of *Comarum palustre* L. and Their Structure Elucidation Using Spectroscopic Methods

Yovana Strugar<sup>✉</sup>, Anastasia A. Orlova, Anastasiia A. Ponkratova, Andrei K. Whaley, Maria N. Povydysh

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Yovana Strugar. E-mail: jovana.strugar12@gmail.com

© Стругар Й., Орлова А. А., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Повыдыш М. Н., 2022  
© Strugar Y., Orlova A. A., Ponkratova A. O., Whaley A. K., Povydysh M. N., 2022

**ORCID:** Yovana Strugar – <https://orcid.org/0000-0002-0816-257>; Anastasia A. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-7836-5785>;  
Anastasiia A. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>;  
Maria N. Povydysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>.

**Received:** 06.09.2022    **Revised:** 21.10.2022    **Published:** 25.11.2022

## **Abstract**

**Introduction.** Medicinal plants are a rich, almost inexhaustible source of medicinal substances, and due to their large chemical diversity of metabolites available for isolation their research is always an important task. One of the promising medicinal plants for research is marsh cinquefoil (*Comarum palustre* L.), widely used in folk medicine for the treatment of diseases of the musculoskeletal system.

**Aim.** Isolation of individual secondary metabolites from the aerial part of *C. palustre* and their subsequent structural elucidation by NMR experiments.

**Materials and methods.** The aerial parts of the marsh cinquefoil, were collected next to the Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University Nursery Garden of Medicinal Plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozerskoe highway, 38 km) in July 2021. Fraction analysis was performed through analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) using a LC-20 Prominence (Shimadzu corp., Japan) equipped with a SPD-M20A diode-array detector. The isolation of compounds was carried out by open column chromatography using sorbents with different selectivity, as well as by preparative HPLC using a Smartline system (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structures of the isolated compounds were established by 1D NMR experiments (Bruker Avance III 400 MHz, Germany).

**Results and discussion.** Seven individual compounds (**1–7**) were isolated and their structures elucidated. Two compounds (**1** and **2**) are derivatives of ellagic acid, namely 4-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside ellagic acid (**1**) and 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside ellagic acid (**2**), while the other five compounds are derivatives of flavonoids: kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucuronide (**3**), quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide (**4**), quercetin-3-O- $\beta$ -D-(6"- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-glucopyranoside (**5**), quercetin-3-O- $\beta$ -D-(2"-galloyl)-glucopyranoside (**6**) and (+)-catechin (**7**).

**Conclusion.** As a result of the current research, seven individual compounds were isolated from the aerial part of the marsh cinquefoil and their structure were elucidated. Compounds **1, 2, 4, 5** and **6** were found and isolated from the aerial part of *C. palustre* L. for the first time.

**Keywords:** *Comarum palustre*, marsh cinquefoil, secondary metabolites, polyphenols, flavonoids

**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.** Strugar Jovana, Anastasia A. Orlova, Anastasiia A. Ponkratova, Andrei K. Whaley performed the experimental part. Strugar Jovana, Anastasiia A. Ponkratova, Maria N. Povydysh took part in preparing of the article text. Maria N. Povydysh supervised the research. All authors took part in the discussion of the results.

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

**For citation:** Strugar Y., Orlova A. A., Ponkratova A. A., Whaley A. K., Povydysh M. N. Isolation of individual compounds from the aerial part of *Comarum palustre* L. and their structure elucidation using spectroscopic methods. *Drug development & registration*. 2022;11(4):177–184. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Поиск новых лекарственных препаратов представляет собой непрерывный процесс благодаря возникновению новых, либо изменчивости существующих заболеваний. Лекарственные растения представляют собой богатый источник биологически активных веществ, в связи с чем их исследование является актуальной задачей [1–8]. В настоящее время создание лекарственных средств растительного происхождения, основанных на ограниченном количестве компонентов с хорошо охарактеризованными структурами и спектрами биологической активности, является целесообразным, поскольку такие фармацевтические препараты часто превосходят по силе синтетические аналоги, а также имеют ряд преимуществ перед традиционно применяемыми суммарными экстрактами растений.

Одним из перспективных лекарственных растений для исследований является сабельник болотный (*Comarum palustre* L.) – многолетнее травянистое растение из семейства Rosaceae (Розоцветные), произ-

растающее в северном полушарии. *C. palustre* применяется в традиционной медицине для лечения заболеваний опорно-двигательной системы [9, 10], а также в качестве противовоспалительного, противовирусного, вяжущего, анальгезирующего средств [11, 12]. На экспериментальных моделях подтвержден ряд фармакологических эффектов таких как гипогликемический, нефропротекторный, противовирусный и антиоксидантный [13, 14]. Согласно литературным данным, основными метаболитами сабельника болотного являются флавоноиды, простые фенолы, фенолкарбоновые кислоты, жирные кислоты, аминокислоты, стероиды, катехины, органические кислоты, кумарины, тритерпеновые сапонины, каротиноиды, моно- и полисахариды [11, 15]. Ранее коллективом автором также проводился сравнительный метаболомный анализ первичных метаболитов надземной и подземной частей *C. palustre*, в результате которого было установлено, что трава является более богатым их источником. Также были впервые идентифицированы аминосахара, спирты, углеводороды, хиноны и альдегиды [16].

Таким образом **целью настоящего исследования** является выделение индивидуальных вторичных метаболитов из травы *Comarum palustre* с последующим установлением их структуры методом ЯМР-спектроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырьем для исследования служила заготовленная в июле 2021 года в окрестностях питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) и высушенная воздушно-теневым методом надземная часть сабельника болотного. Для перемешивания экстракта использовалась механическая мешалка RZR 2021 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия). Для выпаривания экстрактов и фракций использовался вакуумно-ротационный испаритель Hei-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия).

Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором, при 235 и 254 нм. Применялась хроматографическая колонка SUPELCOSIL™ LC-18 (25 см × 4,6 мм) с размером частиц 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура анализа – +40 °C. Элюент: вода (компонент A), ацетонитрил (компонент B) с содержанием ТФУ 0,1 % [с H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (5:95) до H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (0:100), по объему]. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) выполнялась на приборе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин для

ВЭТСХ HPTLC Silica gel 60 F254 plate (Merck KGaA, Германия) (4–8 мкм).

Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности – Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония), Sephadex™ LH-20 (Cytiva, Швеция), а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором при длине волны 254 нм. Применялась препаративная хроматографическая колонка Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5 мкм). Скорость потока элюента 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент A), ацетонитрил (компонент B) с содержанием ТФУ 0,1 % [с H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (5:95) до H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (50:50), по объему].

Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате настоящей работы из травы *C. palustre* были выделены и установлены структуры семи индивидуальных соединений (1–7), пять из которых относятся к классу флавоноидов и два соединения относящихся к классу танинов (рисунок 1).

500г измельченного и просеянного через сито с диаметром отверстий 2 мм сырья подвергали многократной экстракции 70 % этиловым спиртом (EtOH) (2500 мл) при комнатной температуре с использованием механической мешалки. Цикл экстракции проводили 13 раз. Все полученные спиртовые экстракты

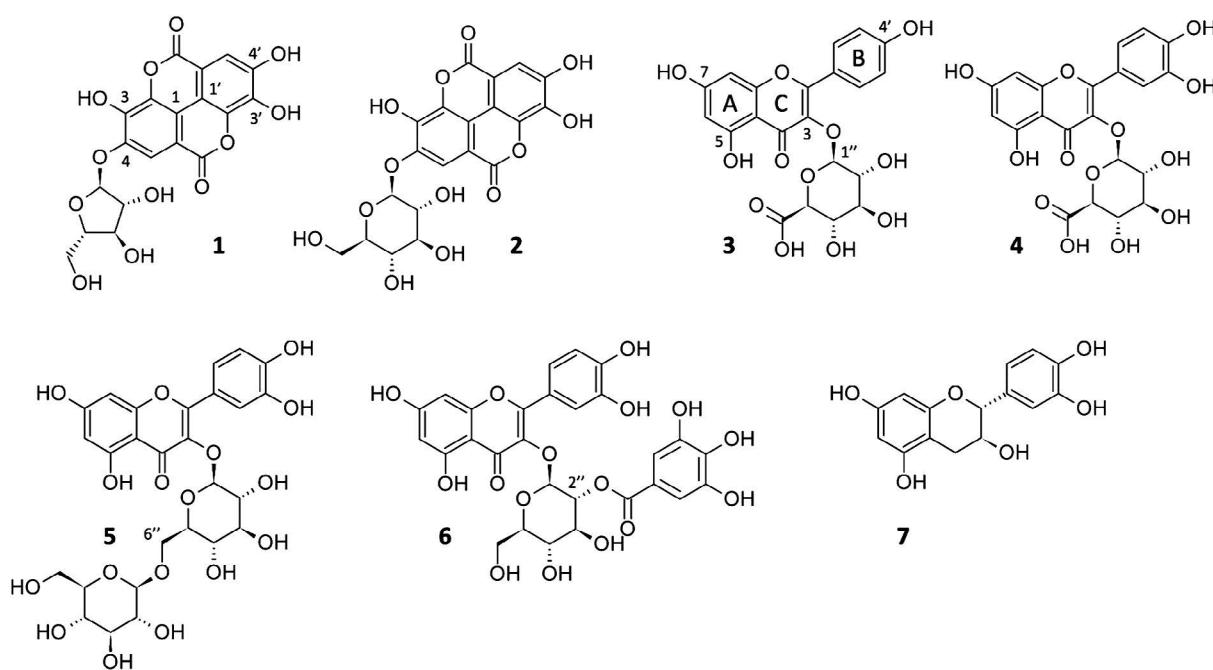


Рисунок 1. Структуры соединений 1–7

Figure 1. Structure of compounds 1–7

объединялись и выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при температуре 60 °C до объема 300 мл. К 300 мл экстракта добавляли 100 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую жидкостно-жидкостную (ЖЖ) экстракцию с равным объемом n-гексана. После чего к спирто-водному остатку добавляли еще 100 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую ЖЖ экстракцию с равным объемом дихлорметана (ДХМ). После чего проводили ЖЖ экстракцию спирто-водного остатка с равным объемом бутанола.

При анализе водной и бутанольной фракций методом ВЭЖХ было установлено, что состав обеих фракций значительно не различался, в следствие чего было принято решение объединить обе фракции для дальнейших исследований. Объединенные бутанольную и водную фракции выпаривали досуха на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C, после чего сухой остаток растворяли в 100 мл 96 % EtOH. Полученный раствор загружали на открытую стеклянную колонку, в качестве стационарной фазы использовали Dianion® HP-20. Проводили градиентное элюирование с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10 % [с H<sub>2</sub>O:96 % EtOH (100:0), H<sub>2</sub>O:96 % EtOH (0:100), по объему]. Собранные фракции анализировались методом TCX в системе БУВ 4:1:2, с целью выявления фракция со схожими компонентами. Фракции, которые имели пятна с одинаковыми факторами удерживания (*R<sub>f</sub>*) и окраской – объединялись. Объединенные фракции выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C до объема 10 мл. Таким образом было получено 24 фракции. Фракцию № 6, полученную при элюировании 40 % EtOH, загружали на открытую колонку, заполненную сорбентом Sephadex™ LH-20, и элюировали 10, 20, 50 %, а затем 100 % EtOH. Собранные фракции анализировались методом TCX в системе БУВ (4:1:2). Таким образом было получено 16 подфракций. Подфракция № 13, 14, 15 подвергались хроматографическому разделению на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе, в результате чего были выделены: соединение 1 (*m* = 5,52 мг, *t<sub>r</sub>* = 18,303 мин); соединение 2 (*m* = 4,03 мг, *t<sub>r</sub>* = 18,544 мин); соединение 3 (*m* = 7,16 мг, *t<sub>r</sub>* = 19,557 мин); соединение 4 (*m* = 10,06 мг, *t<sub>r</sub>* = 20,699 мин);

Подфракции № 7 и 8 подвергались хроматографическому разделению на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе, в результате чего были выделены: соединение 5 (*m* = 6,71 мг, *t<sub>r</sub>* = 18,746 мин), соединение 6 (*m* = 3,29 мг, *t<sub>r</sub>* = 20,024 мин) и соединение 7 (*m* = 9,51 мг, *t<sub>r</sub>* = 14,335 мин).

Соединение 1 представляет собой бело-желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы поглощения в УФ-спектре при 249 и 361 нм. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре соединения присутствуют сигналы протонов характерные для остатков эллаговой кислоты и арабинозы. В ароматической области спект-

ра видны сигналы протонов эллаговой кислоты при δН 7.50 (1Н, с, Н-5) и 7.73 (1Н, с, Н-5'). В алифатической области спектра наблюдаются сигналы протонов остатка арабинозы при δН 5.61 (1Н, д, *J* = 1.2 Гц, Н-1''), 4.34 (1Н, м, Н-2''), 3.97 (1Н, м, Н-3''), 3.87 (1Н, м, Н-4''), 3.61 (1Н, дд, *J* = 12.0, 3.2 Гц, Н-5a'') и 3.25 (1Н, дд, *J* = 11.5, 5.5 Гц, Н-5b''). Сигналы фенольных гидроксилов эллаговой кислоты наблюдались при δН 10.84 (1Н, с, 3-OH), 10.69 (1Н, с, 4'-OH) и 10.58 (1Н, с, 3'-OH). Таким образом, в результате анализа ЯМР-спектров и литературных данных [18], соединение 2 было идентифицировано как 4-O-*α*-L-арабинофуранозид эллаговой кислоты.

Соединение 2 представляет собой бело-желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при  $\lambda_{\max}$  = 248 и 360 нм. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре присутствуют сигналы протонов характерные для остатков эллаговой кислоты и глюкозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов эллаговой кислоты при δН 7.50 (1Н, с, Н-5) и 7.71 (1Н, с, Н-5'). В алифатической области спектра наблюдается сигнал аномерного протона при δН 5.01 (1Н, д, *J* = 7.2 Гц, Н-1''), протона в положении 6а остатка глюкозы при δН 3.86 (1Н, дд, *J* = 10.3, 4.2 Гц, Н-2'') и сигналы остальных протонов находились в диапазоне δН 3.25–3.50 (5Н, м). Сигналы фенольных гидроксилов эллаговой кислоты наблюдались при δН 10.71 (1Н, с, 3-OH), 10.87 (1Н, с, 4'-OH) и 10.59 (1Н, с, 3'-OH). Таким образом, в результате анализа ЯМР-данных и анализа литературных данных [17] соединение 1 было идентифицировано как 4-O-*β*-D-глюкопиранозид эллаговой кислоты.

Данные ЯМР-спектров соединений 1–2 представлены в таблице 1.

Соединение 3 представляет собой желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при  $\lambda_{\max}$  = 265 и 345 нм. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре соединения присутствуют сигналы протонов характерные для кемпферола и глюкуронидного остатка. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при δН 6.23 (1Н, д, *J* = 2.0 Гц, Н-6) и 6.45 (1Н, д, *J* = 2.0 Гц, Н-8) и кольца В при δН 6.89 (2Н, д, *J* = 8.8 Гц, Н-3', 5') и 8.05 (2Н, д, *J* = 8.8 Гц, Н-2', 6'). В алифатической области спектра наблюдается сигнал аномерного протона при δН 5.49 (1Н, д, *J* = 7.2 Гц, Н-1'') и остальных протонов глюкуронидного остатка в диапазоне δН 3.20–3.65 (4Н, м). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при δН 12.68 (1Н, с, 5-OH), 10.83 (1Н, уш. с, 7-OH) и 9.74 (1Н, уш. с, 4'-OH). В результате анализа ЯМР-спектров и литературных данных [18], соединения 4 идентифицировано как кемпферол-3-O-*β*-D-глюкуронид.

Соединение 4 желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы поглощения в УФ-спектре при 251 и 350 нм. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре соединения присутствуют сигналы протонов характерные для кверцетина и глюкуронидного остатка. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при

**Таблица 1.** Данные ЯМР соединений 1–2

**Table 1.** NMR data of compounds 1–2

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2
	$\delta\text{H}$ ( $J$ в Гц) $\delta\text{H}$ ( $J$ , Hz)	$\delta\text{H}$ ( $J$ в Гц) $\delta\text{H}$ ( $J$ , Hz)
5	7.50 (1H, c) 7.50 (1H, s)	7.50 (1H, c) 7.50 (1H, s)
5'	7.73 (1H, c) 7.73 (1H, s)	7.71 (1H, c) 7.71 (1H, s)
1''	5.61 (1H, d, $J$ = 1.2 Гц) 5.61 (1H, d, $J$ = 1.2 Hz)	5.01 (1H, d, $J$ = 7.2 Гц) 5.01 (1H, d, $J$ = 7.2 Hz)
2''	4.34 (1H, m) 4.34 (1H, m)	3.86 (1H, dd, $J$ = 10.3, 4.2 Гц) 3.86 (1H, dd, $J$ = 10.3, 4.2 Hz)
3''	3.97 (1H, m) 3.97 (1H, m)	3.25–3.50 (5H, m) 3.25–3.50 (5H, m)
4''	3.87 (1H, m) 3.87 (1H, m)	3.25–3.50 (5H, m) 3.25–3.50 (5H, m)
5''	–	3.25–3.50 (5H, m) 3.25–3.50 (5H, m)
5a''	3.61 (1H, dd, $J$ = 12.0, 3.2 Гц) 3.61 (1H, dd, $J$ = 12.0, 3.2 Hz)	–
5b''	3.25 (1H, dd, $J$ = 11.5, 5.5 Гц) 3.25 (1H, dd, $J$ = 11.5, 5.5 Hz)	–
6''	–	3.25–3.50 (5H, m) 3.25–3.50 (5H, m)
3-OH	10.84 (1H, c) 10.84 (1H, s)	10.71 (1H, c) 10.71 (1H, s)
3'-OH	10.58 (1H, c) 10.58 (1H, s)	10.59 (1H, c) 10.59 (1H, s)
4'-OH	10.69 (1H, c) 10.69 (1H, s)	10.87 (1H, c) 10.87 (1H, s)

$\delta\text{H}$  6.22 (1H, d,  $J$  = 2.0 Гц, H-6) и 6.42 (1H, d,  $J$  = 2.0 Гц, H-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.53 (1H, d,  $J$  = 2.2 Гц, H-2'), 6.85 (1H, d,  $J$  = 8.5 Гц, H-5') и 7.62 (1H, dd,  $J$  = 8.5, 2.2 Гц, H-6'). В алифатической области спектра наблюдается сигнал аномерного протона при  $\delta\text{H}$  5.51 (1H, d,  $J$  = 7.3 Гц, H-1'') и остальных протонов глюкуронидного остатка в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.20–3.60 (H4, m). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.57 (1H, c, 5-OH), 10.90 (1H, уш. с, 7-OH), 9.76 (1H, уш. с, 4'-OH) и 9.23 (1H, уш. с, 3'-OH). Таким образом, в результате анализа ЯМР-данных и данных литературы [18, 19], соединение 3 было идентифицировано как кверцетин-3-O- $\beta$ -D-(6''- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глюкопиранозид.

Соединение 5 представляет собой желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы поглощения в УФ спектре при 258 и 351 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре соединения присутствуют сигналы протонов характерные для кверцетина и двух углеводных остатка. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.19 (1H, d,  $J$  = 1.9 Гц, H-6) и 6.40 (1H, d,  $J$  = 1.9 Гц, H-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.56 (1H, d,  $J$  = 2.2 Гц, H-2'), 6.85 (1H, d,  $J$  = 8.5 Гц, H-5') и 7.67 (1H, d,  $J$  = 8.5, 2.2 Гц, H-6'). В алифатической области спектра наблюдаются сигналы аномерных протонов при  $\delta\text{H}$  5.73 (1H, d,  $J$  = 7.3 Гц, H-1'') и 4.59 (1H, d,  $J$  = 7.2 Гц, H-1'''), а также остальных протонов двух остат-

ков глюкозы в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.0–3.75 (12H, m). Сигналы фенольных гидроксилов наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.68 (1H, c, 5-OH), 10.83 (1H, уш. с, 7-OH), 9.74 (1H, уш. с, 4'-OH) и 9.19 (1H, уш. с, 3'-OH). В результате анализа ЯМР-данных и данных литературы [20], соединение 5 идентифицировано как кверцетин-3-O- $\beta$ -D-(6''- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глюкопиранозид.

Соединение 6 – желтое кристаллическое вещество, с максимумами поглощения в УФ-спектре при 266 и 356 нм. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре присутствуют сигналы протонов характерные для кемпферола, остатков галловой кислоты и глюкозы. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  6.19 (1H, d,  $J$  = 2.0 Гц, H-6) и 6.38 (1H, d,  $J$  = 2.0 Гц, H-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  7.51 (1H, m, H-2'), 6.84 (1H, d,  $J$  = 8.5 Гц, H-5') и 7.60 (1H, m, H-6'), а также протонов остатка галловой кислоты при  $\delta\text{H}$  7.05 (2H, с, H-2'',6''). В алифатической области спектра наблюдается сигнал аномерного протона при  $\delta\text{H}$  5.79 (1H, d,  $J$  = 7.7 Гц, H-1''), протона в положении 2 остатка глюкозы при  $\delta\text{H}$  5.02 (1H, dd,  $J$  = 9.0, 8.2 Гц, H-2'') и сигналы остальных протонов находились в диапазоне  $\delta\text{H}$  3.50–3.80 (5H, m). Сигналы фенольных гидроксилов кверцетина наблюдались при  $\delta\text{H}$  12.52 (1H, c, 5-OH), 10.87 (1H, c, 7-OH), 9.77 (1H, c, 4'-OH) и 9.76 (1H, уш. с, 3'-OH), в то время как сигналы фенольных гидроксилов галловой кислоты наблюдались при  $\delta\text{H}$  9.24 (2H, с, 3'',5''-OH)

и 8.90 (1Н, с, 4"-ОН). На основании анализа ЯМР-спектров и литературных данных [18], соединение 6 было идентифицировано как кверцетин-3-O-β-D-(2"-галлоил)-глюкопиранозид.

Соединение 7 – желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимум поглощения при  $\lambda_{\max} = 278$  нм. В ароматической области спектра видны сигналы протонов кольца А при  $\delta\text{H}$  5.69 (1Н, д,  $J = 2.2$  Гц, Н-6) и 5.89 (1Н, д,  $J = 2.2$  Гц, Н-8) и кольца В при  $\delta\text{H}$  6.72 (2Н, д,  $J = 1.9$  Гц, Н-2'), 6.69 (2Н, д,  $J = 8.0$  Гц, Н-5') и 6.59 (1Н, дд,  $J = 8.0, 1.9$  Гц, Н-6'). В али-

фатической области спектра видны сигналы кольца С при  $\delta\text{H}$  2.35 (1Н, дд,  $J = 15.7, 8.3$  Гц, Н-4а), 2.66 (1Н, дд,  $J = 16.0, 5.2$  Гц, Н-4), 3.81 (1Н, м, Н-3) и 4.48 (1Н, д,  $J = 7.4$  Гц, Н-2). Сигналы фенольных гидроксилов кислоты наблюдались при  $\delta\text{H}$  9.16 (1Н, с, 5-ОН) и в диапазоне  $\delta\text{H}$  8.6–9.0 (3Н, 7-ОН, 3'-ОН, 4'-ОН). На основании данных ЯМР-спектра и литературных данных [19, 21], соединение 7 было идентифицировано как (+)-ка-техин.

Данные ЯМР-спектров соединений 3–7 приведены в таблице 2.

**Таблица 2. Данные ЯМР соединений 3–7**

**Table 2. NMR data of compounds 3–7**

Положение Position	Соединение 3 Compound 3	Соединение 4 Compound 4	Соединение 5 Compound 5	Соединение 6 Compound 6	Соединение 7 Compound 7
	$\delta\text{H}$ (J в Гц) $\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{H}$ (J в Гц) $\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{H}$ (J в Гц) $\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{H}$ (J в Гц) $\delta\text{H}$ (J, Hz)	$\delta\text{H}$ (J в Гц) $\delta\text{H}$ (J, Hz)
2	–		–	–	4.48 (1Н, д, $J = 7.4$ Гц) 4.48 (1Н, д, $J = 7.4$ Hz)
3	–		–	–	3.81 (1Н, м) 3.81 (1Н, m)
4	–		–	–	2.66 (1Н, дд, $J = 16.0, 5.2$ Гц) 2.66 (1Н, dd, $J = 16.0, 5.2$ Hz)
4a	–		–	–	2.35 (1Н, дд, $J = 15.7, 8.3$ Гц) 2.35 (1Н, dd, $J = 15.7, 8.3$ Hz)
6	6.23 (1Н, д, $J = 2.0$ Гц) 6.23 (1Н, d, $J = 2.0$ Hz)	6.22 (1Н, д, $J = 2.0$ Гц) 6.22 (1Н, d, $J = 2.0$ Hz)	6.19 (1Н, д, $J = 1.9$ Гц) 6.19 (1Н, d, $J = 1.9$ Hz)	6.19 (1Н, д, $J = 2.0$ Гц) 6.19 (1Н, d, $J = 2.0$ Hz)	5.69 (1Н, д, $J = 2.2$ Гц) 5.69 (1Н, d, $J = 2.2$ Hz)
8	6.45 (1Н, д, $J = 2.0$ Гц) 6.45 (1Н, d, $J = 2.0$ Hz)	6.42 (1Н, д, $J = 2.0$ Гц) 6.42 (1Н, d, $J = 2.0$ Hz)	6.40 (1Н, д, $J = 1.9$ Гц) 6.40 (1Н, d, $J = 1.9$ Hz)	6.38 (1Н, д, $J = 2.0$ Гц) 6.38 (1Н, d, $J = 2.0$ Hz)	5.89 (1Н, д, $J = 2.2$ Гц) 5.89 (1Н, d, $J = 2.2$ Hz)
2'	8.05 (2Н, д, $J = 8.8$ Гц) 8.05 (2Н, d, $J = 8.8$ Hz)	7.53 (1Н, д, $J = 2.2$ Гц) 7.53 (1Н, d, $J = 2.2$ Hz)	7.56 (1Н, д, $J = 2.2$ Гц) 7.56 (1Н, d, $J = 2.2$ Hz)	7.51 (1Н, м) 7.51 (1Н, m)	6.72 (2Н, д, $J = 1.9$ Гц) 6.72 (2Н, d, $J = 1.9$ Hz)
3'	6.89 (1Н, д, $J = 8.8$ Гц) 6.89 (1Н, d, $J = 8.8$ Hz)	–	–	–	–
5'	6.89 (1Н, д, $J = 8.8$ Гц) 6.89 (1Н, d, $J = 8.8$ Hz)	6.85 (1Н, д, $J = 8.5$ Гц) 6.85 (1Н, d, $J = 8.5$ Hz)	6.85 (1Н, д, $J = 8.5$ Гц) 6.85 (1Н, d, $J = 8.5$ Hz)	6.84 (1Н, д, $J = 8.5$ Гц) 6.84 (1Н, d, $J = 8.5$ Hz)	6.69 (2Н, д, $J = 8.0$ Гц) 6.69 (2Н, d, $J = 8.0$ Hz)
6'	8.05 (2Н, д, $J = 8.8$ Гц) 8.05 (2Н, d, $J = 8.8$ Hz)	7.62 (1Н, дд, $J = 8.5, 2.2$ Гц) 7.62 (1Н, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz)	7.67 (1Н, д, $J = 8.5, 2.2$ Гц) 7.67 (1Н, d, $J = 8.5, 2.2$ Hz)	7.60 (1Н, м) 7.60 (1Н, m)	6.59 (1Н, дд, $J = 8.0, 1.9$ Гц) 6.59 (1Н, dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz)
5-OH	12.68 (1Н, с) 12.68 (1Н, s)	12.57 (1Н, с) 12.57 (1Н, s)	12.68 (1Н, с) 12.68 (1Н, s)	12.52 (1Н, с) 12.52 (1Н, s)	–
7-OH	10.83 (1Н, уш. с) 10.83 (1Н, brs)	10.90 (1Н, уш. с) 10.90 (1Н, brs)	10.83 (1Н, уш. с) 10.83 (1Н, brs)	10.87 (1Н, с) 10.87 (1Н, s)	–
3'-OH	–	9.23 (1Н, уш. с) 9.23 (1Н, brs)	9.19 (1Н, уш. с) 9.19 (1Н, brs)	9.76 (1Н, уш. с) 9.76 (1Н, brs)	–
4'-OH	9.74 (1Н, уш. с) 9.74 (1Н, brs)	9.76 (1Н, уш. с) 9.76 (1Н, brs)	9.74 (1Н, уш. с) 9.74 (1Н, brs)	9.77 (1Н, с) 9.77 (1Н, s)	–
1''	5.49 (1Н, д, $J = 7.2$ Гц) 5.49 (1Н, d, $J = 7.2$ Hz)	5.51 (1Н, д, $J = 7.3$ Гц) 5.51 (1Н, d, $J = 7.3$ Hz)	5.73 (1Н, д, $J = 7.3$ Гц) 5.73 (1Н, d, $J = 7.3$ Hz)	5.79 (1Н, д, $J = 7.7$ Гц) 5.79 (1Н, d, $J = 7.7$ Hz)	–
2''	3.20–3.65 (4Н, м) 3.20–3.65 (4Н, m)	3.20–3.60 (4Н, м) 3.20–3.60 (4Н, m)	3.0–3.75 (1Н, м) 3.0–3.75 (1Н, m)	5.02 (1Н, дд, $J = 9.0, 8.2$ Гц) 5.02 (1Н, dd, $J = 9.0, 8.2$ Hz)	–
3''–5''	3.20–3.65 (4Н, м) 3.20–3.65 (4Н, m)	3.20–3.60 (4Н, м) 3.20–3.60 (4Н, m)	3.0–3.75 (5Н, м) 3.0–3.75 (5Н, m)	3.50–3.80 (5Н, м) 3.50–3.80 (5Н, m)	–
6''	–	–	3.0–3.75 (5Н, м) 3.0–3.75 (5Н, m)	3.50–3.80 (5Н, м) 3.50–3.80 (5Н, m)	–
1'''	–	–	4.59 (1Н, д, $J = 7.2$ Гц) 4.59 (1Н, d, $J = 7.2$ Hz)	–	–
2'''–6'''	–	–	3.0–3.75 (6Н, м) 3.0–3.75 (6Н, m)	7.05 (2Н, с) 7.05 (2Н, s)	–
3'''–OH, 5'''–OH	–	–	–	9.24 (2Н, с) 9.24 (2Н, s)	–
4'''–OH	–	–	–	8.90 (1Н, с) 8.90 (1Н, s)	–

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования из травы *Comarum palustre* были выделены и охарактеризованы структуры семи (1–7) индивидуальных соединений. Согласно полученным данным  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии, два соединения (1 и 2) являются производными эллаговой кислоты, а именно: 4-O- $\alpha$ -L-арабинофуранозид эллаговой кислоты (1), 4-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид эллаговой кислоты (2) и пять соединений являются производными флавоноидов: кемферол-3-O- $\beta$ -D-глюкуронид (3), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-глюкуронид (4), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-(6''- $\beta$ -D-глюкопиранозил)-глюкопиранозид (5), кверцетин-3-O- $\beta$ -D-(2''-галлоил)-глюкопиранозид (6) и (+)-catechin (7). Соединения 1, 2, 3, 5 и 6 обнаружены и выделены из надземной части *Comarum palustre* L. впервые.

## ЛИТЕРАТУРА

- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K., Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*. 2010;8(1):1–10.
- Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Новикова В. В., Безверхняя Е. А. Противомикробная активность соединений полифенольной природы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):65–72. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72.
- Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбaryan С. П., Повыдыш М. Н. Выделения формононетин-7-O- $\beta$ -D-глюкопиранозида из травы сельника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):14–19. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19.
- Peddoju A., Singh S., Mca S. Review: Medicinal Plant use for the treatment of Diabetes. *SSRN*. 2019;6(2):968–975.
- Salleh N. H., Zulkipli I. N., Yasin H. M., Jaafar F., Ahmad N., Ahmad W. A. N. W., Ahmad S. R. Systematic review of medicinal plants used for treatment of diabetes in human clinical trials: an ASEAN perspective. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2021;2021:1–10.
- Pranskuniene Z., Balciunaite R., Simaitiene Z., Bernatoniene J. Herbal medicine uses for respiratory system disorders and possible trends in new herbal medicinal recipes during COVID-19 in pasvalys district, Lithuania. *Environmental research and public health*. 2022;19:8905.
- Ray S., Saini M. K. Cure and prevention of cardiovascular diseases: herbs for heart. *Clinical Phytoscience*. 2021;7:64.
- Singh S., Singh T. G., Mahajan K., Dhiman S. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72(10):1306–1327.
- Buzuk G. N., Lovkova M. Y., Ershik O. A., Sokolova S. M. A new source of Proanthocyanidins with antiarthritic activity: Purple marshlocks (*Comarum palustre* L.) rhizome and roots. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2008;421(1):211–213.
- Shirinsky I. V., Kalinovskaya N. Y., Filatova K., Shirinsky V. S. Pleiotropic effects of *Comarum palustre* L. in patients with osteoarthritis and diabetes mellitus with high comorbidity burden: an exploratory study. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2021;27(S1):80–84.
- Стругар Й., Повыдыш М. Н. Химические компоненты *Comarum palustre* L. и их биологическая активность. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2020;22(12):126–140.
- Yorshik O. A., Buzuk G. N. Antiviral activity of proanthocyanidins in the western marsh cinquefoil. *Bulletin of the Vitebsk State Medical University*. 2015;14(2):107–112.
- Ovodova R. G., Popov S. V., Bushneva O. A., Golovchenko V. V., Chizhov A. O., Klinov D. V., Ovodov Y. S. Branching of the galacturonan backbone of comaruman, a pectin from the marsh cinquefoil *Comarum palustre* L. *Biochemistry*. 2006;71(5):538–542.
- Bikmulina G. A., Popova N. A. Study of the pharmacotherapeutic efficacy of the dry extract of the marsh cinquefoil in postischemic nephropathy in white rats. *Acta Biomedica Scientifica*. 2008;3(61):47.
- Скляревская Н. В. Фармакогностическое изучение надземной части сельника болотного (*Comarum palustre* L.), произрастающего на Северо-Западе России. Дис. ... канд. фарм. наук. Санкт-Петербург, 2009. Доступно по: [https://www.dissertac.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-nadzemnoi-chasti-sabelnika-boletnogo-comarum-palustre-l-proiz](https://www.dissertac.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-nadzemnoi-chasti-sabelnika-bolotnogo-comarum-palustre-l-proiz). Ссылка активна на 06.09.2022.
- Стругар Й., Орлова А. А., Повыдыш М. Н. Сравнительный ГХ-МС анализ состава метаболитов надземной и подземной части сельника болотного (*Comarum palustre* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):95–103. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-95-103.
- Yoshida T., Amakura Y., Liu Y. Z., Okuda T. Tannins and related polyphenols of Euphorbiaceous Plants. XI. Three new hydrolyzable tannins and a polyphenol glucoside from *Euphorbia humifusa*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1994;42(9):1803–1807.
- Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Серебряков Е. Б., Смирнов С. Н., Прокш П., Ионов Н. С., Поройков В. В., Лужанин В. Г. Фитохимический анализ вторичных метаболитов полифенольной природы в листьях морошки обыкновенной (*Rubus chamaemorus* L.). *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(3):22–27.
- Olennikov D. N. Ellagittannins and other phenolic compounds from *Comarum palustre*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2016;52(4):721–723.
- Cho, Y. H., Kim N. H., Khan I., Yu J. M., Jung H. G., Kim H. H., An B. J. Anti-inflammatory potential of Quercetin-3-O- $\beta$ -D-(2''-galloyl)-glucopyranoside and Quercetin isolated from *Diospyros kaki* calyx via suppression of MAP signaling molecules in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Food Science*. 2016;81(10):C2447–C2456.
- Zaman S., Hye M. A., Taher M. A., Ali M. Y., Ali M. U. Isolation of (+)-Catechin from Acacia Catechu (Cutch Tree) by a Convenient Method. *Journal of Scientific Research*. 2009;1(2):300–305.

## REFERENCES

- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K., Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*. 2010;8(1):1–10.
- Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Novikova V. V., Bezverkhniaia E. A. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds. *Drug development & registration*. 2022;11(2):65–72. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72.
- Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharo M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N. Isolation of formononetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):14–19. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19.
- Peddoju A., Singh S., Mca S. Review: Medicinal Plant use for the treatment of Diabetes. *SSRN*. 2019;6(2):968–975.
- Salleh N. H., Zulkipli I. N., Yasin H. M., Jaafar F., Ahmad N., Ahmad W. A. N. W., Ahmad S. R. Systematic review of medicinal plants used for treatment of diabetes in human clinical trials: an ASEAN perspective. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2021;2021:1–10.

6. Pranskuniene Z., Balciunaite R., Simaitiene Z., Bernatoniene J. Herbal medicine uses for respiratory system disorders and possible trends in new herbal medicinal recipes during COVID-19 in pasvalys district, Lithuania. *Environmental research and public health.* 2022;19:8905.
7. Ray S., Saini M. K. Cure and prevention of cardiovascular diseases: herbs for heart. *Clinical Phytoscience.* 2021;7:64.
8. Singh S., Singh T. G., Mahajan K., Dhiman S. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2020;72(10):1306–1327.
9. Buzuk G. N., Lovkova M. Y., Ershik O. A., Sokolova S. M. A new source of Proanthocyanidins with antiarthritic activity: Purple marshlocks (*Comarum palustre* L.) rhizome and roots. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2008;421(1):211–213.
10. Shirinsky I. V., Kalinovskaya N. Y., Filatova K., Shirinsky V. S. Pleiotropic effects of *Comarum palustre* L. in patients with osteoarthritis and diabetes mellitus with high comorbidity burden: an exploratory study. *Alternative Therapies in Health and Medicine.* 2021;27(S1):80–84.
11. Strugar J., Povydysh M. N. Chemical components of *Comarum palustre* L. and their biological activity. *Medical & pharmaceutical journal «Pulse».* 2020;22(12):126–140 (In Russ.)
12. Yorshik O. A., Buzuk G. N. Antiviral activity of proanthocyanidins in the western marsh cinquefoil. *Bulletin of the Vitebsk State Medical University.* 2015;14(2):107–112.
13. Ovodova R. G., Popov S. V., Bushneva O. A., Golovchenko V. V., Chizhov A. O., Klinov D. V., Ovodov Y. S. Branching of the galacturonan backbone of comaruman, a pectin from the marsh cinquefoil *Comarum palustre* L. *Biochemistry.* 2006;71(5):538–542.
14. Bikmulina G. A., Popova N. A. Study of the pharmacotherapeutic efficacy of the dry extract of the marsh cinquefoil in postischemic nephropathy in white rats. *Acta Biomedica Scientifica.* 2008;3(61):47.
15. Sklyarevskaya N. V. Pharmacognostic study of the aerial part of the marsh cinquefoil (*Comarum palustre* L.) growing in the North-West of Russia [dissertation]. St. Petersburg; 2009. Available at: <https://www.dissertcat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-nadzemnoi-chasti-sabelnika-bolotnogo-comarum-palustre-l-proiz>. Accessed: 06.09.2022. (In Russ.)
16. Strugar J., Orlova A. A., Povydysh M. N. Comparative GC-MS analysis of the composition of metabolites of aboveground and underground parts of *Comarum palustre* L. *Drug development & registration.* 2021;10(4–1):95–103. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-95-103.
17. Yoshida T., Amakura Y., Liu Y. Z., Okuda T. Tannins and related polyphenols of Euphorbiaceous Plants. XI. Three new hydrolyzable tannins and a polyphenol glucoside from *Euphorbia humifusa*. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 1994;42(9):1803–1807.
18. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of polyphenol secondary metabolites in cloudberry (*Rubus Chamaemorus* L.) leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2021;55(3):253–258. (In Russ.)
19. Olennikov D. N. Ellagitannins and other phenolic compounds from *Comarum palustre*. *Chemistry of Natural Compounds.* 2016;52(4):721–723.
20. Cho, Y. H., Kim N. H., Khan I., Yu J. M., Jung H. G., Kim H. H., An B. J. Anti-inflammatory potential of Quercetin-3-O- $\beta$ -D-(“2”-galloyl)-glucopyranoside and Quercetin isolated from *Diospyros kaki* calyx via suppression of MAP signaling molecules in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Food Science.* 2016;81(10): C2447–C2456.
21. Zaman S., Hye M. A., Taher M. A., Ali M. Y., Ali M. U. Isolation of (+)-Catechin from Acacia Catechu (Cutch Tree) by a Convenient Method. *Journal of Scientific Research.* 2009;1(2):300–305.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-185-193>  
УДК 615.072:615.322



Оригинальная статья / Research article

## Индивидуальные соединения корневищ и корней родиолы четырехлепестной (*Rhodoila quadrifida*): выделение и установление структуры

А. В. Лёзина<sup>✉</sup>, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, 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. 14, лит. А

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Лёзина Алёна Владимировна. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

ORCID: А. В. Лёзина – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. О. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 21.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Лекарственное растительное сырье, содержащее в себе широкий спектр разнообразных биологически активных соединений, представляет значительный интерес как вероятный источник новых, фармакологически активных БАВ. Одним из перспективных растений является *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey, поскольку в сырье отмечается наличие фенольных соединений и их производных, обуславливающих противовоспалительное, антиоксидантное и антиканцерогенное действие. Кроме того, данное растение, имеет значительную популярность в народной медицине в качестве БАД.

**Цель.** Выделение индивидуальных соединений из корневищ и корней родиолы четырехлепестной и последующее установление их структуры методами ЯМР и масс-спектрометрии для фитохимического профилирования.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали корневища и корни *Rh. quadrifida*, приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга (место и время заготовки по информации на упаковке – Алтай (г. Барнаул), март 2019 года). Полученные в ходе последовательной жидкость-жидкостной экстракции фракции (этанольную, гексановую, бутанольную и водную) этанольного извлечения исследовали на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A для определения хроматографического профиля. Наиболее перспективную этилацетатную фракцию очищали методами колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности и препаративной хроматографии [Smartline (Knauer, Германия)]. Структуру полученных индивидуальных соединений устанавливали методом ЯМР (Bruker Avance III 400 MHz, Германия) и подтверждали масс-спектрометрией низкого разрешения [Flexar FX-15 (PerkinElmer, США)].

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования из корневищ и корней *Rhodiola quadrifida* было выделено 7 индивидуальных соединений, а именно: 3,4-дигидроксибензойная кислота, 4-гидроксибензойная кислота, кофейная кислота, этилгаллат, катехин, эпикатехин и тирозол. Данные соединения впервые выделены из сырья родиолы четырехлепестной. Они являются мажоритарными соединениями и могут характеризовать фитохимический профиль сырья, а также определять направления фармакологической активности.

**Заключение.** Впервые из сырья *Rhodiola quadrifida* выделено и методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии доказано структуру 7 мажоритарных соединений, что может служить фундаментом для дальнейшего изучения этого вида родиолы и целевого изучения его фармакологической активности *in vitro* и *in vivo* с учетом индивидуального фитохимического профиля.

**Ключевые слова:** *Rhodiola quadrifida*, индивидуальные соединения, полифенолы, препаративная хроматография, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия

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

**Вклад авторов.** Все авторы участвовали в разработке дизайна эксперимента. Идея исследования принадлежит руководителю научной группы И. И. Тернинко. А. В. Лёзина и А. О. Уэйли выполняли экспериментальную часть по выделению индивидуальных соединений. Интерпретация результатов ЯМР-спектроскопического исследования была проведена А. К. Уэйли. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

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

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность научному сотруднику ИЛ (ЦККЛС) к. фарм. н. Н. Ю. Сипкиной за помощь в получении масс-спектров.

**Для цитирования:** Лёзина А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Тернинко И. И. Индивидуальные соединения корневищ и корней родиолы четырехлепестной (*Rhodiola quadrifida*): выделение и установление структуры. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):185–193. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-185-193>

## Individual Compounds of *Rhodoila quadrifida* Rhizomes and Roots: Isolating and Establishing Structure

Alyona V. Lezina<sup>✉</sup>, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Whaley, Inna I. Terninko

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Alyona V. Lezina. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

© Лёзина А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Тернинко И. И., 2022  
© Lezina A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Terninko I. I., 2022

**ORCID:** Alyona V. Lezina – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Anastasiia O. Whaley – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

**Received:** 06.09.2022      **Revised:** 21.10.2022      **Published:** 25.11.2022

### **Abstract**

**Introduction.** Medicinal plant raw materials, containing a wide range of various biologically active compounds, are of considerable interest as a likely source of new, pharmacologically active biologically active substances. One of the promising plants is *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey, since the raw materials contain phenolic compounds and their derivatives, which cause anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic effects. In addition, this plant has considerable popularity in folk medicine as a dietary supplement.

**Aim.** Isolation of individual compounds from rhizomes and roots of *Rhodiola quadrifida* and subsequent determination of their structure by NMR and mass spectrometry for phytochemical profiling.

**Materials and methods.** Rhizomes and roots of *Rhodiola quadrifida*, purchased in the pharmacy of St. Petersburg (place and time of procurement according to the information on the package – Altai (near Barnaul), in March 2019. The ethanol extract fractions (ethanol, hexane, butanol, and water) obtained during sequential liquid-liquid extraction were examined on a LC-20 Prominence instrument (Shimadzu, Japan) with an SPD-M20A diode array detector to determine the chromatographic profile. The most promising ethyl acetate fraction was purified by column chromatography on open glass columns with sorbents of different selectivity and preparative chromatography [Smartline (Knauer, Germany)] with a spectrophotometric detector. The structure of the obtained individual compounds was determined by NMR (Bruker Avance III 400 MHz, Germany) and confirmed by low-resolution mass spectrometry [Flexar FX-15 (PerkinElmer, USA)].

**Results and discussion.** During the study, 7 individual compounds were isolated from the rhizomes and roots of *Rhodiola quadrifida*, namely 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, ethyl gallate, catechin, epicatechin and tyrosol. These compounds were isolated for the first time from the raw materials of *Rhodiola quadrifida*. They are the major compounds and can characterize the phytochemical profile of raw materials, as well as determine the direction of pharmacological activity.

**Conclusion.** For the first time, *Rhodiola quadrifida* was isolated from raw materials and the structure of 7 majority compounds was proved by NMR spectroscopy and mass spectrometry, which can serve as a foundation for further study of this species of Rhodiola and targeted study of its pharmacological activity *in vitro* and *in vivo*, considering the individual phytochemical profile.

**Keywords:** *Rhodiola quadrifida*, individual compounds, polyphenols, preparative chromatography, NMR spectroscopy, mass spectrometry

**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 participated in the design of the experiment. The idea of the study belongs to the head of the scientific group – I.I. Terninko. A.V. Lezina and A.O. Whaley performed the experimental part of isolating individual compounds. The interpretation of the results of the NMR spectroscopic study was carried out by A.K. Whaley. All authors participated in the discussion of the results and writing 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.

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude to the researcher of the research laboratory of the drug quality control center, Ph.D. N. Y. Sipkina for assistance in obtaining mass spectra.

**For citation:** Lezina A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Terninko I. I. Individual compounds of *Rhodoila quadrifida* rhizomes and roots: isolating and establishing structure. *Drug development & registration*. 2022;11(4):185–193. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-185-193>

## **ВВЕДЕНИЕ**

На современном этапе развития фармацевтической отрасли лекарственное растительное сырье (ЛРС) является одним из источников получения новых фармацевтических субстанций [1]. Это связано с увеличением доли растительных средств в ассортименте аптечных сетей и применением средств на растительной основе в народной медицине. Кроме того, разнонаправленный спектр биологически активных веществ (БАВ) в составе растений [2] создает предпосылки для поиска новых потенциальных активных фармацевтических ингредиентов. Однако недостаточная доказательность клинической эффективности комплексных растительных препаратов,

обусловленная отсутствием понятного механизма действия в ряду «структура – фармакологический ответ», а также поливалентностью различных химических соединений, ограничивает их применение в официальной медицине. Это создает предпосылки для маркирования фитохимического профиля ЛРС с целью их индивидуализации, что возможно за счет выделения основных соединений и установления их структуры. Значительная часть современных фитохимических исследований [3–5] имеют данную направленность.

Родиола четырехлепестная [*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey] – многолетнее травянистое растение семейства Толстянковые (*Crassulaceae*), имеющее четко очерченный ареал произрастания,

ограниченный территорией Китая, Монголии, Тибета, Малой Азии и Западной Сибири [6, 7]. Сырье ро-диолы применяется в народной медицине в качестве противовоспалительного, гемостатического и тонизирующего средства в виде БАД [8, 9]. Дан-ные о фитохимическом составе *R. quadrifida* в лите-ратуре ограничены. Сообщается [10] о наличии в сырье фенольных соединений: кверцетина, кемп-ферола, скополетина, умбелиферона и родоспеци-фичных тирозола и салидрозида. Японскими учены-ми M. Yoshikawa, H. Shimada из метанольного экст-ракта были выделены родиоцианозиды A и B, родио-флавонозид и родиооктанозид и редкий флавон, ха-рактерный преимущественно для представителей семейства *Myrtaceae* – трицептин. Методом атомно-эмиSSIONНОЙ спектроскопии с индуктивно связанный плазмой (АЭС-ИП) количественно установлен мине-ральный состав ро-диолы четырехлепестной [11]. Ра-нее нами методом высокоеффективной тонкослой-ной хроматографии (ВЭТСХ) было доказано наличие синаповой, розмариновой и кофейной кислот [12]. Ограничность данных о фитохимическом составе *R. quadrifida* в совокупности с популярность данного растения в народной медицине позволяет позициони-ровать его в качестве целевого объекта для инди-видуализации фитохимического профиля.

**Цель работы** – выделение индивидуальных со-единений из корневищ и корней ро-диолы четырехлеп-естной и последующее установление их структуры методами ЯМР и масс-спектрометрии для фитохими-ческого профилирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служило воздушно-сухое ЛРС – корневища и корни ро-диолы четырехлепест-ной – приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Пе-тербурга в качестве БАД. Информация на упаковке и сертификате качества подтверждает соответствие за-явленного вида и отражает место и время заготовки – Алтай (г. Барнаул), март 2019 года.

Точную навеску измельченного сырья (размер частиц 5–7 мм) массой 600 г помещали в экстрактор, извлечение проводили 70%-м этианолом [соотноше-ние сырье:экстрагент (1:10)] методом мацерации при комнатной температуре 3 раза в течение 24 ч (общее время – 72 часа), каждый раз декантируя жид-кость. Водно-спиртовые извлечения объединяли и упаривали в вакуумно-ротационном аппарате Hei-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Гер-мания) до водного остатка, а затем отстаивали в хо-лодильнике 12 часов. Образовавшийся осадок от-фильтровывали. Полученную водную вытяжку под-вергали последовательной трехкратной жидкостно-жидкостной экстракции (соотношение водного из-влечения и экстрагента 3:1) органическими раство-рителями (квалификация «х.ч.», АО «Вектон», Россия) различной полярности в делительной воронке: гекса-

ном, этилацетатом и *n*-бутанолом. Экстракцию каж-дым растворителем проводили в течение 10 минут.

В результате последовательной жидкость-жи-дкостной экстракции были получены 4 фракции: гек-сановая (ГФ), этилацетатная (ЭФ), бутанольная (БФ) и водная (ВФ). Все фракции уменьшали в объеме по-средством концентрирования в вакууме до 100 мл.

Хроматографический профиль каждой фракции определяли аналитической высокоеффективной жид-костной хроматографией (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с колонкой SUPELCOSIL™ LC-18, оснащенным диодно-матричный детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Условия хроматографирования представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Условия проведения высокоеффективной жидкостной хроматографии**

**Table 1. Conditions for high performance liquid chromatography**

Колонка Column	250 × 4,6 мм, эндкапрированный окта-децилсилил (C18) силикагель для хро-матографии, 5 мкм 250×4.6 mm, endcapped octadecylsilyl (C18) silica gel for chromatography, 5 μm
ПФ Mobile phase	Подвижная фаза А – деионизированная вода с добавлением трифторуксусной кислоты (ТФУ, Chemical Line, Россия) 0,1 %, (v/v). Подвижная фаза В – ацетонитрил клас-са «ВЭЖХ» (HPLC for UV/Gradient Grade (J.T. Baker, США) с добавлением ТФУ 0,1 %, (v/v) Mobile phase A is deionized water with the addition of trifluoroacetic acid (TFA, Chemical Line, Russia) 0.1 %, (v/v). Mobile phase B is HPLC grade acetonitrile (HPLC for UV/Gradient Grade (J.T. Baker, USA) with the addition of TFA 0.1 %, (v/v)
Способ элюирования Elution method	Градиентный режим: 0–5 мин 5 % В; 5–45,75 мин 100 % В; 45,75–50 мин 100 % В; 50–60 мин 5 % В; 60–65 мин 5 % В Gradient mode: 0–5 min 5 % B; 5–45.75 min 100 % B; 45.75–50 min 100 % B; 50–60 min 5 % B; 60–65 min 5 % B
Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	1
Температура колонки, °C Column temperature, °C	40 ± 1
Детектор Detector	Диодноматричный, $\lambda = 235$ нм Diode array, $\lambda = 235$ nm
Объем вводимой пробы, мкл The volume of input samples, $\mu$ l	10
Время хроматографирования, мин Time chromatography, min	65

Проводили фракционирование наиболее пер-спективной ЭФ методом открытой колоночной хро-матографии. Стеклянную открытую колонку заполня-ли сорбентом Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония), наносили ЭФ, после чего элюировали эта-

нолом с повышением концентрации от 10 до 50 % (шаг 10 %). Контроль очистки и разделения компонентов фракции проводили методом TCX [в системе *n*-бутанол:ледяная уксусная кислота:вода (4:1:2)] на пластинках HPTLC Silica gel 60 F254 plate (Merck KGaA, Германия). Подфракции со схожим компонентным составом (количество, цвет и  $R_f$  пятен) объединяли, упаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C до 10 мл. Наиболее перспективные (количество пятен) полученные подфракции для дополнительной очистки наносили на колонку, заполненную сорбентом Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) и элюировали этанолом 96 %. Компонентный состав полученных очищенных подфракций изучали методом TCX в указанных выше условиях, подфракции с одинаковым числом компонентов – объединяли и упаривали. Очищенные подфракции подвергали хроматографическому разделению на хроматографе Smartline (Knauer, Германия), оборудованном спектрофотометрическим детектором, при длине волн 235 нм. Колонка для препаративной хроматографии – Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5 мкм). Скорость потока элюента 40 мл/мин. Подвижная фаза: вода деионизированная с содержанием ТФУ 0,1 %, (v/v) (компонент А) и ацетонитрил класса «ВЭЖХ» с содержанием ТФУ 0,1 %, (v/v) (компонент В). Элюирование проводили в градиентном режиме с 1 по 5 минут 5 % компонент В (изократический режим), с 5 по 40 минут 5–60 % В (линейный градиент), с 40 до 45 минуты 5 % В (изократический режим, приведение колонки в равновесие).

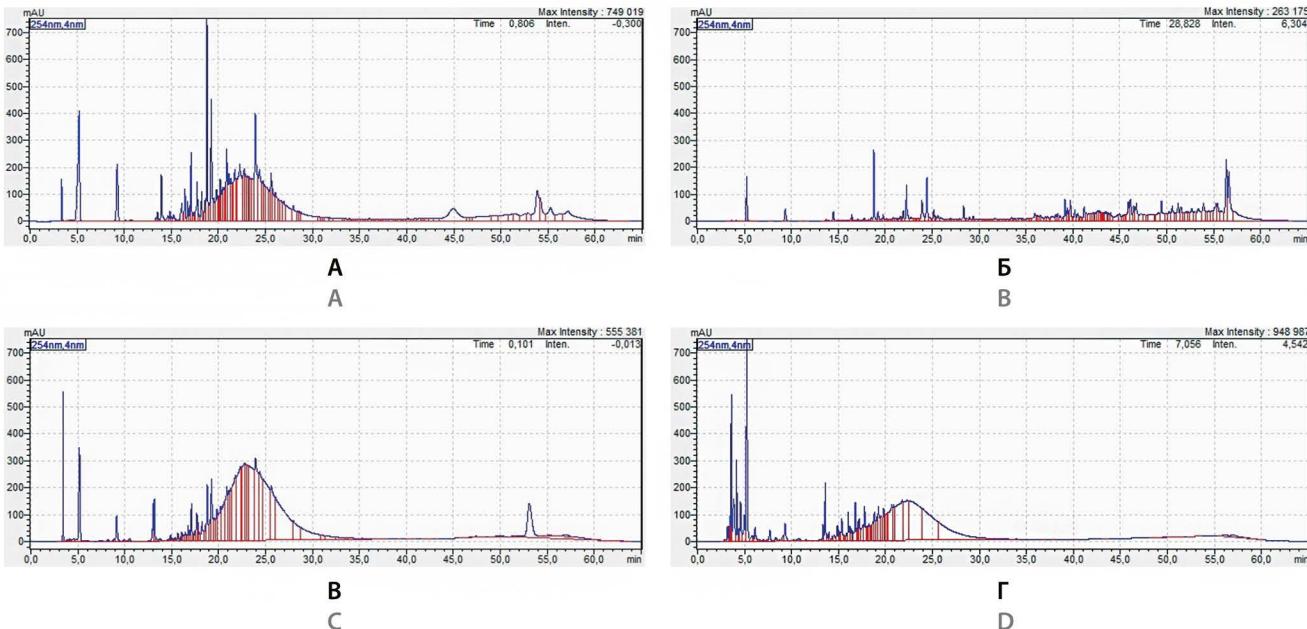
Коллекционирование фракций проводили вручную одновременно с выходом пика на хроматограмме. Контроль чистоты полученных соединений проводили с использованием системы аналитической ВЭЖХ. Полученные фракции выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °C до 5 мл, после чего замораживали и высушивали методом лиофильной сушки. Высушенные соединения перерастворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде ( $\text{DMSO}-d_6$ , ООО «Кемикал Лайн», Россия).

Структуру выделенных соединений устанавливали на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета методами одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрии низкого разрешения (96%-е этанольные растворы выделенных компонентов) на хромато-масс-спектрометре Flexar FX-15 (PerkinElmer, США) детектор масс-спектрометрический сингл квадрупольный, способ ионизации – электrospray (ESI) в режиме сканирования SCAN в диапазоне масс 100–400, в положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на базе ЦКП «Аналитический центр» СПХФУ в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический профиль каждой фракции представлен на рисунке 1.

Согласно данным хроматограмм, приведенных на рисунке 1, наиболее перспективной оказалась ЭФ, по-



**Рисунок 1. Результаты предварительного ВЭЖХ-анализа 4 фракций:**

**А – этилацетатная; Б – гексановая; В – *n*-бутанольная; Г – водная**

**Figure 1. Results of preliminary HPLC analysis of 4 fractions:**

**A – ethyl acetate; B – hexane; C – *n*-butanol; D – aqueous**

скольку количество и интенсивность пиков вещества демонстрируют достаточное количество для очистки и дальнейшего выделения методом препаративной хроматографии. ГФ показала наибольшее количество пиков соединений, но их качественное содержание (по данным интенсивности без учета отклика детектора) было недостаточным для препаративного выделения.

В результате проведенного исследования было выделено 7 индивидуальных соединений. Результаты изучения ЯМР указанных веществ представлены в таблице 2.

Установлено, что соединение 1 является 3,4-дигидроксибензойной кислотой (протокатеховая). На 1Н-ЯМР спектре 3,4-дигидроксибензойной кислоты присутствовали шесть сигналов, три из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа АМХ, при  $\delta$ H 6.92 (1H, d, J = 8.0 Гц, H-5), 7.24 (1H, d, J = 1.9 Гц, H-2) и 7.27 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Гц, H-6). Остальные три сигнала в спектре относились к протонам OH групп двух фенольных гидроксилов при  $\delta$ H 9.53 (1H, s, OH-3) и 9.71 (1H, s, OH-4), а также к протону COOH группы при  $\delta$ H 10.10 (1H, s, COOH).

Соединение 2 было идентифицировано как 4-гидроксибензойная кислота, поскольку на 1Н-ЯМР-спектре присутствовали четыре сигнала, два из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа AA2XX2, при  $\delta$ H 6.83 (2H, d, J = 8.7 Гц, H-3, H-4) и 7.79 (2H, d, J = 8.7 Гц, H-2, H-6). Остальные два сигнала в спектре относились к протону OH группы фенольного гидроксила при  $\delta$ H 10.21 (1H, s, OH-4) и к протону COOH группы при  $\delta$ H 12.38 (1H, s, COOH).

В 1Н-ЯМР-спектре соединения 3 присутствовали восемь сигналов, три из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа АМХ, при  $\delta$ H 6.76 (1H, d, J = 8.1 Гц, H-5), 7.02 (1H, d, J = 2.0 Гц, H-2) и 6.96 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Гц, H-6). Еще два СН протона образовывали спиновую систему типа AX при  $\delta$ H 6.17 (1H, d, J = 15.8 Гц, H- $\beta$ ) и 7.41 (1H, d, J = 15.8 Гц, H- $\alpha$ ). Остальные сигналы спектра соответствовали двум протонам фенольных гидроксилов при  $\delta$ H 9.12 (1H, s, OH-3) и 9.52 (1H, s, OH-4), а также к протону COOH группы при  $\delta$ H 12.11 (1H, brs, COOH). Таким образом, соединение 3 было идентифицировано как кофейная кислота.

В 1Н-ЯМР-спектре соединения 4 присутствовали пять сигналов, соответствующие 10 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов CH<sub>3</sub>— и —CH<sub>2</sub>— групп при  $\delta$ H 1.27 (3H, t, J = 7.1 Гц) и 4.21 (2H, q, J = 7.1 Гц), соответственно. Сигнал двух ароматических протонов наблюдался при  $\delta$ H 6.95 (2H, s, H-2, H-6). Остальные два сигнала относились к протонам фенольных гидроксилов при  $\delta$ H 8.91 (1H, s, OH-4) и 9.24 (2H, s, OH-3, OH-5). Согласно данным ЯМР-спектра, а также литературным данным, соединение 4 было идентифицировано как эти-

ловый эфир галловой кислоты – этилгаллат. Ранее методом ВЭТСХ в сырье родиолы четырехлепестной было установлено наличие галловой кислоты, что подтверждает правильность выводов.

Соединения 5 и 6 были идентифицированы как катехин и эпикатехин, соответственно. В 1Н-ЯМР-спектре катехина присутствовали тринадцать сигналов, соответствующие 13 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов кольца С при  $\delta$ H 2.35 (1H, dd, J = 16.0, 8.1 Гц, H-4a), 2.66 (1H, dd, J = 16.0, 5.2 Гц, H-4b), 3.82 (1H, m, H-3) и 4.48 (1H, d, J = 7.6 Гц, H-2). В ароматической области наблюдались сигналы протонов кольца А, образуя спиновую систему типа AX, при  $\delta$ H 5.90 (1H, d, J = 2.2 Гц, H-6) и 5.69 (1H, d, J = 2.2 Гц, H-8) и протонов кольца В, образуя спиновую систему типа AMX, при  $\delta$ H 6.72 (1H, d, J = 1.8 Гц, H-22), 6.68 (1H, d, J = 8.0 Гц, H-52) и 6.59 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Гц, H-62). Остальные сигналы относились к протонам фенольных гидроксилов при  $\delta$ H 8.79 (1H, s, OH-32), 8.84 (1H, s, OH-42), 8.92 (1H, s, OH-7) и 9.16 (1H, s, OH-5).

В 1Н-ЯМР-спектре эпикатехина также присутствовали тринадцать сигналов, соответствующие 13 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов кольца С при  $\delta$ H 2.48 (1H, dd, J = 16.5, 3.3 Гц, H-4a), 2.66 (1H, dd, J = 16.4, 4.3 Гц, H-4b), 4.01 (1H, m, H-3) и 4.74 (1H, brs, H-2). В ароматической области наблюдались сигналы протонов кольца А, образуя спиновую систему типа AX, при  $\delta$ H 5.90 (1H, d, J = 2.1 Гц, H-8) и 5.72 (1H, d, J = 2.1 Гц, H-6) и протонов кольца В, образуя спиновую систему типа AMX, при  $\delta$ H 6.90 (1H, d, J = 1.1 Гц, H-22), 6.66 (1H, m, H-52) и 6.66 (1H, m, H-62). Остальные сигналы относились к протонам фенольных гидроксилов при  $\delta$ H 8.80 (4H, brs, OH-32, OH-42, OH-7) и 9.10 (1H, s, OH-5).

Соединение 7 было идентифицировано как тирозол (ранее идентифицирован методом ВЭТСХ и ВЭЖХ). В 1Н-ЯМР-спектре присутствовали шесть сигналов, соответствующие 10 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов двух CH<sub>2</sub> групп при  $\delta$ H 2.65 (2H, t, J = 7.3 Гц, H-7) и 3.56 (2H, t, J = 7.3 Гц, H-8), соответственно. Сигнал четырех ароматических протонов наблюдался при  $\delta$ H 6.71 (2H, d, J = 8.3 Гц, H-3, H-4) и 7.02 (2H, d, J = 8.3 Гц, H-2, H-6), образуя единую спиновую систему типа AA2XX2. Остальные два сигнала соответствовали алифатическому гидроксили и фенольному гидроксили при  $\delta$ H 4.56 (1H, brs) и 9.13 (1H, brs), соответственно.

Структуру выделенных соединений дополнительно подтверждали методом масс-спектрометрии. Характеристические ионы выделенных соединений приведены в таблице 3.

Данные соединения впервые выделены из сырья родиолы четырехлепестной. Они являются мажорными, характеризуют фитохимический профиль сырья и маркеры для стандартизации, а также определяют направления фармакологической активности.

Таблица 2. Результаты ЯМР выделенных индивидуальных соединений из сырья *Rhodiola quadrifida*

Table 2. NMR results of isolated compounds from raw materials *Rhodiola quadrifida*

Положение Position	Соединение 1 Compound 1		Соединение 2 Compound 2		Соединение 3 Compound 3		Соединение 4 Compound 4		Соединение 5 Compound 5		Соединение 6 Compound 6		Соединение 7 Compound 7		
	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	$\delta$ H (в Гц) $\delta$ H (J, Hz)	
2	7.24 (1H, d, J = 1.9 Гц) 7.24 (1H, d, J = 1.9 Hz)	7.79 (2H, d, J = 8.7 Гц) 7.79 (2H, d, J = 8.7 Hz)	7.02 (1H, d, J = 2.0 Гц) 7.02 (1H, d, J = 2.0 Hz)	6.95 (2H, s)	—	—	—	—	—	—	7.02 (2H, d, J = 8.0 Гц) 7.02 (2H, d, J = 8.0 Hz)	—	—	—	
3	—	6.83 (2H, d, J = 8.7 Гц) 6.83 (2H, d, J = 8.7 Hz)	—	—	—	—	—	—	—	—	6.71 (2H, d, J = 8.3 Гц) 6.71 (2H, d, J = 8.3 Hz)	—	—	—	
4	—	6.83 (2H, d, J = 8.7 Гц) 6.83 (2H, d, J = 8.7 Hz)	—	—	—	—	—	—	—	—	6.71 (2H, d, J = 8.3 Гц) 6.71 (2H, d, J = 8.3 Hz)	—	—	—	
5	6.92 (1H, d, J = 8.0 Гц) 6.92 (1H, d, J = 8.0 Hz)	—	6.76 (1H, d, J = 8.1 Гц) 6.76 (1H, d, J = 8.1 Hz)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	7.27 (1H, dd, J = 80, 1.9 Гц) 7.27 (1H, dd, J = 80, 1.9 Hz)	7.79 (2H, d, J = 8.7 Гц) 7.79 (2H, d, J = 8.7 Hz)	6.96 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Гц) 6.96 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz)	6.95 (2H, s)	5.90 (1H, d, J = 2.2 Гц) 5.90 (1H, d, J = 2.2 Hz)	5.72 (1H, d, J = 2.1 Гц) 5.72 (1H, d, J = 2.1 Hz)	7.02 (2H, d, J = 8.3 Гц) 7.02 (2H, d, J = 8.3 Hz)	—	—	—	—	—	—	—	
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.69 (1H, d, J = 2.2 Гц) 5.69 (1H, d, J = 2.2 Hz)	5.90 (1H, d, J = 2.1 Гц) 5.90 (1H, d, J = 2.1 Hz)	—	—	
2'	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.72 (1H, d, J = 1.8 Гц) 6.72 (1H, d, J = 1.8 Hz)	6.90 (1H, d, J = 1.1 Гц) 6.90 (1H, d, J = 1.1 Hz)	—	—	
5'	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.68 (1H, d, J = 8.0 Гц) 6.68 (1H, d, J = 8.0 Hz)	6.66 (1H, m)	—	—	
6'	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.59 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Гц) 6.59 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Hz)	6.66 (1H, m)	—	—	
3-OH	9.53 (1H, s)	—	9.12 (1H, s)	9.24 (2H, s)	—	—	—	—	—	—	—	9.13 (1H, brs)	—	—	
4-OH	9.71 (1H, s)	10.21 (1H, s)	9.52 (1H, s)	8.91 (1H, s)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5-OH	—	—	—	9.24 (2H, s)	9.16 (1H, s)	9.10 (1H, s)	—	—	—	—	—	—	—	—	
7-OH	—	—	—	—	—	8.92 (1H, s)	8.80 (4H, brs)	—	—	—	—	4.56 (1H, brs)	—	—	
2'-OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
3'-OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.80 (4H, brs)	—	—	
4'-OH	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.84 (1H, s)	—	—	
COOH	10.10 (1H, s)	12.38 (1H, s)	—	12.11 (1H, brs)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
H-a	—	—	—	7.41 17 (1H, d, J = 15.8 Гц) 7.41 17 (1H, d, J = 15.8 Hz)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Окончание таблицы 2

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2	Соединение 3 Compound 3	Соединение 4 Compound 4	Соединение 5 Compound 5	Соединение 6 Compound 6	Соединение 7 Compound 7
	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$	$\delta_{\text{H}} (\text{J в Гц})$ $\delta_{\text{H}} (\text{J, Hz})$
H-β	—	—	6.17 (1H, d, J = 15.8 Гц) 6.17 (1H, d, J = 15.8 Hz)	—	—	—	—
2H	—	—	—	—	—	—	—
3H	—	—	—	4.21 (2H, q, J = 7.1 Гц) 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz)	—	—	—
H-4a	—	—	—	—	2.35 (1H, dd, J = 16.0, 8.1 Гц) 2.35 (1H, dd, J = 16.0, 8.1 Hz)	2.48 (1H, dd, J = 16.5, 3.3 Гц) 2.48 (1H, dd, J = 16.5, 3.3 Hz)	—
H-4b	—	—	—	—	2.66 (1H, dd, J = 16.0, 5.2 Гц) 2.66 (1H, dd, J = 16.0, 5.2 Hz)	2.66 (1H, dd, J = 16.4, 4.3 Гц) 2.66 (1H, dd, J = 16.4, 4.3 Hz)	—
H-3	—	—	—	—	3.82 (1H, m)	4.01 (1H, m)	—
H-2	—	—	—	—	4.48 (1H, d, J = 7.6 Гц) 4.48 (1H, d, J = 7.6 Hz)	4.74 (1H, brs.)	—
H-7	—	—	—	—	—	2.65 (2H, t, J = 7.3 Гц) 2.65 (2H, t, J = 7.3 Hz)	—
H-8	—	—	—	—	—	3.56 (2H, t, J = 7.3 Гц) 3.56 (2H, t, J = 7.3 Hz)	—

**Таблица 3. Результаты масс-спектрометрического анализа индивидуальных соединений *Rhodiola quadrifida***

**Table 3. Results of mass spectrometric analysis of individual compounds of *Rhodiola quadrifida***

№	Структурная формула Structural formula	Химическое название (тривиальное название) Chemical name (trivial title)	Характеристические ионы Characteristic ions, m/z
1		3,4-дигидроксибензойная (протокатеховая) кислота 3,4-dihydroxybenzoic (protocatechuic) acid	Молекулярный ион m/z 153 в отрицательной ионизации Molecular ion m/z 153 in negative ionization
2		4-гидроксибензойная кислота 4-hydroxybenzoic acid	Молекулярный ион m/z 137 в отрицательной ионизации Molecular ion m/z 137 in negative ionization
3		3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеновая (кофейная) кислота 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic (caffeoic) acid	Осколочные ионы m/z 179, 163, 164 в положительной ионизации Fragment ions m/z 179, 163, 164 in positive ionization
4		Этил 3,4,5-тригидроксибензоат (этилгаллат/ этиловый эфир галловой кислоты) Ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (ethyl gallate/ ethyl ester of gallic acid)	Осколочный ион m/z 125 в положительной ионизации Fragment ion m/z 125 in positive ionization
5		(2R, 3S)-2-(3',4'-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2Н-хромен-3,5,7-триол(カテхин) (2R, 3S)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol (catechin)	Осколочный ион m/z 139 в положительной ионизации Fragment ion m/z 139 in positive ionization
6		(2R, 3R)-2-(3',4'-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2Н-хромен-3,5,7-триол(эпикатехин) (2R, 3R)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol(epicatechin)	Осколочный ион m/z 139 в положительной ионизации Fragment ion m/z 139 in positive ionization
7		4-(2-гидроксиэтил)фенол (тирозол) 4-(2-hydroxyethyl)phenol(tyrosol)	Осколочный ион m/z 179 в положительной ионизации Fragment ion m/z 179 in positive ionization

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые из корневищ и корней родиолы четырехлепестной выделены 7 веществ – протокатеховая, 4-гидроксибензойная, кофейная кислоты, этилгаллат, катехин, эпикатехин, тирозол – структура которых была установлена методом ЯМР-спектроскопии и подтверждена масс-спектрометрией. Данные вещества можно отнести к мажоритарным и принять в качестве определяющих фитохимический профиль этого вида родиолы. Данные литературы [12] о наличии кофейной кислоты и тирозола в сырье *Rhodiola quadrifida* подтверждают результаты исследования.

Мажоритарное накопление предшественников дубильных веществ – катехина, эпикатехина, этилгаллата – дает возможность предположить превалирова-

ние данной группы БАВ в сырье родиолы четырехлепестной и рассматривать их в качестве маркеров при стандартизации комплексных препаратов на основе этого вида ЛРС.

Результаты исследования создают предпосылки для целевого изучения фармакологической активности сырья родиолы четырехлепестной с учетом биологического действия отдельных выделенных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

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

2. Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганапольский В. П., Ятманов А. Н., Шабанов П. Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2017;15(2):56–63. DOI: 10.17816/RCF15256-63.
3. Сайбель О. Л., Радимич А. И., Даргава Т. Д., Лупанова И. А., Ферубко Е. В., Курманова Е. Н., Мартынчик И. А. Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4):36–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45
4. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоксианидинов типа A из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86
5. Горянинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н. Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):137–141. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141
6. Khokhlova K. 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.
7. Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study. *Medicinal Research Reviews.* 2019;39(5):1779–1850. DOI: 10.1002/med.21564.
8. Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (*Crassulaceae*) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique.* 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
9. Yoshikawa M., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vasorelaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* LEVL. et VANT.: moxartenone and moxartenolide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1996;44(9):656–662. DOI: 10.1248/cpb.44.1656.
10. Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (*Crassulaceae*) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique.* 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
11. Тернинко И. И., Лёзина А. В., Генералова Ю. Э., Романова М. А. Анализ элементного состава отдельных видов *Sedum (Rhodiola)* spp. и *Orthilia secunda*. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(1):132–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-132-139.
12. Лёзина А. В. Изучение отдельных классов фенилпропаноидов растений рода *Rhodiola* методом высокоеффективной тонкослойной хроматографии. В: Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург: СПХФУ; 2021. С. 68–73.
3. Saybel O. L., Radimich A. I., Dargaeva T. D., Lupanova I. A., Ferubko E. V., Kurmanova E. N., Martynchik I. A. Phenolic compounds and hepatoprotective activity of chicory herb extract. *Drug development & registration.* 2021;10(4):36–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45.
4. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Drug development & registration.* 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
5. Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N. A Technology for isolation and analysis of lipophilic and hydrophilic biologically active components from *N. sativa* L. seeds. *Drug development & registration.* 2020;9(3):137–141. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141.
6. Khokhlova K. 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.
7. Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study. *Medicinal Research Reviews.* 2019;39(5):1779–1850. DOI: 10.1002/med.21564.
8. Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (*Crassulaceae*) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique.* 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
9. Yoshikawa M., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vasorelaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* LEVL. et VANT.: moxartenone and moxartenolide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1996;44(9):656–662. DOI: 10.1248/cpb.44.1656.
10. Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (*Crassulaceae*) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique.* 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
11. Terninko I. I., Lezina A. V., Generalova Yu. E., Romanova M. A. Analysis of the elemental composition of individual Species *Sedum (Rhodiola)* spp. and *Orthilia secunda*. *Drug development & registration.* 2022;11(1):132–139. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-132-139.
12. Lezina A. V. The study of individual classes of phenylpropanoids of plants of the genus *Rhodiola* by high performance thin layer chromatography. In: Collection of materials of the XI All-Russian scientific conference of students and graduate students with international participation "Young pharmacy – the potential of the future". St. Petersburg: SPHFU; 2021. P. 68–73.

## REFERENCES

1. Turyshev A. Y., Belonogova V. D., Orlova A. A., Sidorov K. O., Skornikova A. Y. Medicinal flora of the Middle Urals – a prospective source of obtaining medicines. *Drug development & registration.* 2021;10(4–1):32–36. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-32-36.
2. Sambukova T. V., Ovchinnikov B. V., Ganapol'sky V. P., Yatmanov A. N., Shabanov P. D. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy.* 2017;15(2):56–63. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF15256-63.



## Исследования по созданию стоматологического геля с ацизолом

**А. Л. Голованенко<sup>1</sup>✉, И. В. Алексеева<sup>1</sup>, Е. С. Березина<sup>1</sup>, Е. В. Флисюк<sup>2</sup>, У. В. Ногаева<sup>2</sup>,  
И. А. Титович<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

<sup>2</sup> 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: Голованенко Анна Леонидовна. E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

**ORCID:** А. Л. Голованенко – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>; И. В. Алексеева – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>; Е. С. Березина – <https://orcid.org/10000-0002-4122-2414>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; У. В. Ногаева – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>.

**Статья поступила:** 28.06.2022

**Статья принята в печать:** 01.11.2022

**Статья опубликована:** 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Актуальным направлением в фармации является разработка аппликационных лекарственных форм с высокой биологической доступностью и длительным эффектом для применения в стоматологии. Лекарственные препараты в виде гелей обладают рядом преимуществ перед другими традиционно применяемыми лекарственными формами для профилактики и лечения кариеса. Ацизол, содержащий цинк в ионизированном состоянии, входящий в состав таких препаратов, снижает риск развития кариеса за счет подавления агрессивных свойств мягких зубных отложений.

**Цель.** На основании поэтапного комплекса исследований разработать стоматологический гель с ацизолом.

**Материалы и методы.** Для исследования использовали гели с активной фармацевтической субстанцией – ацизол–бис – (1 – винилимидазол) цинк диацетат (ФС 000286-191211.2011, ООО «Макиз-Фарма», Россия, серия 101218, срок хранения 3 года); осново- и гелеобразующие компоненты – На-КМЦ С75 (ТУ 2231-002-50277563-2000, База химической продукции «Югреактив», Россия, серия 151118, срок хранения 3 года), метилцеллюлоза – 35 (ТУ 2231-107-57684455-2003, АО «УЗПХ», Россия, серия 221218, срок хранения 3 года), альгинат натрия (ТУ 15-02-544-83, База химической продукции «Югреактив», Россия, серия 151018, срок хранения 3 года), глицерол (ФС.2.2.0006.15 «Глицерин», АО «Купавнареактив», Россия, серия 082018, срок хранения 3 года), вода очищенная (ФС.2.2.0020.18 «Вода очищенная»). В ходе исследований использовались технологические, химические, физико-химические, физические и биофармацевтические методы.

**Результаты и обсуждение.** В результате комплекса проведенных экспериментальных исследований разработан состав, предложена рациональная технология, определены показатели качества, проведена стандартизация и установлен предварительный срок хранения нового стоматологического геля с ацизолом. В процессе стандартизации геля модифицированы и апробированы методики, которые могут быть использованы для контроля качества геля в процессе изготовления и хранения. Степень высвобождения ацизола из геля определена кондуктометрическим методом, информативным, быстрым и простым в исполнении. Исследована стабильность геля при хранении и выбран упаковочный материал, позволяющий сохранить показатели качества в пределах нормы.

**Заключение.** Проведенные исследования показали перспективность разработки геля с ацизолом. Предложенные методы анализа могут быть рекомендованы к использованию для оценки качества геля в процессе изготовления и хранения, а также для включения в нормативную документацию.

**Ключевые слова:** гель, ацизол, цинк, кариес, исследование, стандартизация

**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:** Голованенко А. Л., Алексеева И. В., Березина Е. С., Флисюк Е. В., Ногаева У. В., Титович И. А. Исследования по созданию стоматологического геля с ацизолом. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):194–200. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-194-200>

## Research on the Creation of Dental Gel with Acyzol

**Anna L. Golovanenko<sup>1</sup>✉, Irina V. Alekseeva<sup>1</sup>, Elena S. Berezina<sup>1</sup>, Elena V. Flisyuk<sup>2</sup>,  
Ulyana V. Nogaeva<sup>2</sup>, Irina A. Titovich<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

✉ Corresponding author: Anna L. Golovanenko. E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

**ORCID:** Anna L. Golovanenko – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>; Irina V. Alekseeva – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>; Elena S. Berezina – <https://orcid.org/10000-0002-4122-2414>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Ulyana V. Nogaeva – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>.

**Received:** 28.06.2022

**Revised:** 01.11.2022

**Published:** 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** An urgent trend in pharmacy is the development of application dosage forms with high bioavailability and long-term effect for use in dentistry. Medicinal preparations in the form of gels have a number of advantages over other traditionally used dosage forms for the prevention and treatment of caries. Acyzol, containing zinc in an ionized state, which is part of such preparations, reduces the risk of caries by suppressing the aggressive properties of soft dental deposits.

**Aim.** Aim of the study. On the basis of a step-by-step complex of studies, to develop a dental gel with acisol.

**Materials and methods.** For the study, we used gels with an active pharmaceutical substance – acisol-bis – (1 – vinylimidazole) zinc diacetate (FC 000286-191211.2011, LLC "Makiz-Pharma", Moscow, Russia, series 101218, shelf life 3 years); basic and gel-forming components – Na-KMC C75 (TU 2231-002-50277563-2000, Base of chemical products "Yugreaktiv", Russia, series 151118, shelf life 3 years), methylcellulose – 35 (TU 2231-107-57684455-2003, JSC "UZPH", Russia, series 221218, shelf life 3 years), sodium alginate (TU 15-02-544-83, Base of chemical products "Yugreaktiv", Russia, series 151018, shelf life 3 years) glycerol (FS.2.2.0006.15 "Glycerin", JSC "Kupavnareaktiv", Russia, series 082018, shelf life 3 years), purified water (FS.2.2.0020.18 "Purified water"). During the research, technological, chemical, physicochemical, physical and biopharmaceutical methods were used.

**Results and discussion.** As a result of a complex of experimental studies, a composition was developed, a rational technology was proposed, quality indicators were determined, standardization was carried out and a preliminary shelf life of a new dental gel with acisol was established. In the process of gel standardization, methods have been modified and tested, which can be used to establish the good quality of the gel during its manufacture and storage. The degree of release of acyzol from the gel was determined by the conductometric method, informative, fast and easy to perform. The stability of the gel during storage was investigated and a packaging material was selected that allows keeping the quality indicators within the normal range.

**Conclusion.** The studies carried out have shown the prospects for the development of a gel with acisol. The proposed methods of analysis can be recommended for use to assess the good quality of the gel in the process of manufacturing and storage, as well as for inclusion in regulatory documents.

**Keywords:** gel, acisol, zinc, caries, research, standardization

**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 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:** Golovanenko A. L., Alekseeva I. V., Berezina E. S., Flisyuk E. V., Nogaeva U. V., Titovich I. A. Research on the creation of dental gel with acyzol. *Drug development & registration.* 2022;11(4):194–200. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-194-200>

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальным направлением в фармации является разработка аппликационных лекарственных форм (ЛФ) с высокой биологической доступностью и длительным эффектом для применения в стоматологии. Лекарственные препараты (ЛП) в виде гелей обладают рядом преимуществ перед другими традиционно применяемыми ЛФ для профилактики и лечения кариеса. Ацизол, содержащий цинк в ионизированном состоянии, входящий в состав таких препаратов, снижает риск развития кариеса за счет подавления агрессивных свойств мягких зубных отложений.

В настоящее время ассортимент цинкодержащих ЛП для профилактики и лечения кариеса, содержащих цинк с высокой биологической доступностью достаточно ограничен [1]. Поэтому, поиск и апробация новых ЛП для применения в практической стома-

тологии с высокой степенью проникновения цинка в твердые ткани зуба не теряет свою актуальность и востребованность.

## Цель

На основании поэтапного комплекса исследований разработать стоматологический гель с ацизолом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Объектами исследования являлись три серийных образца гелей.

Активная фармацевтическая субстанция (АФС) – ацизол-бис – (1 – винилимидазол) цинк диацетат (ФС 000286-191211.2011, ООО «Макиз-Фарма», Россия, серия 101218, срок хранения 3 года).

Осново- и гелеобразующие компоненты: Na-КМЦ С75 (ТУ 2231-002-50277563-2000, База химической продукции «Юреактив», Россия, серия 151118, срок хранения 3 года), метилцеллюлоза – 35 (ТУ 2231-107-57684455-2003, АО «УЗПХ», Россия, серия 221218, срок хранения 3 года), альгинат натрия (ТУ 15-02-544-83, База химической продукции «Юреактив», Россия, серия 151018, срок хранения 3 года).

Вспомогательные вещества: глицерол (ФС.2.2.0006.15 «Глицерин», АО «Купавнареактив», Россия, серия 082018, срок хранения 3 года), вода очищенная (ФС.2.2.0020.18 «Вода очищенная»), консерванты: нипагин (ООО «Альфа-Вета.Ком», серия 092018, срок хранения 3 года) инипазол (ООО «ЭкоХим-Инновации», Россия, серия 071518, срок хранения 3 года).

Оборудование: аналитические весы HR-150AG (AND, Корея); кондуктометр АНИОН-4100 (ООО НПП «Инфраспак-Аналит», Россия), преобразователь ионометрический И-500 (№ 2549, АО «Аквилон», Россия), термометр лабораторный стеклянный ТЛС-5 (0–100 °C, № 00364), верхнеприводная лабораторная мешалка RW 11 basic "Lab eqq" (IKA, Германия).

## Методы

**Органолептический контроль** заключался в проверке внешнего вида, однородности, отсутствия расслоения и комкования.

**Определение степени высвобождения.** Для исследования применяли кондуктометрию, основанную на изучении электрической проводимости водного раствора. Модельной средой служила вода очищенная, имеющая небольшое значение электропроводимости. Объем воды очищенной соответствовал такому количеству, чтобы навеска ЛФ могла переходить в растворенное состояние. В условиях проводимого эксперимента сопротивление мембранны диффузионному потоку ЛС было равно нулю, ее функцию выполняла вода. Это обеспечивало полное высвобождение ЛС [4].

**Методика:** около 1,0 г геля (точная навеска) помещают на дно цилиндра, диаметром 40 мм, объемом 150 см<sup>3</sup>, добавляют 100 мл воды очищенной, опускают электрод, подключенный к кондуктометру, уровень жидкости при этом должен превышать верхние края электрода, в ходе эксперимента систему терmostатируют в интервале температур от (25 ± 2) °C до (37 ± 2) °C, что обеспечивает использованием контактного термометра. Через каждые 3 минуты измеряют удельную электрическую проводимость. По результатам измерений строят кривые динамики высвобождения ЛС из образцов геля.

Для определения **подлинности аизола** в геле использовалась не фармакопейная реакция на катион цинка, входящего в структуру аизола [2].

**Методика:** 0,5 г геля растворяют в 6 мл воды очищенной, на предметное стекло помещают 1 каплю полученного раствора, высушивают, сверху наносят 1 каплю раствора щавелевой кислоты 5 %. Постепенно по краю капли образуются прозрачные кристаллы прямоугольной формы.

**Количественное определение аизола** в геле проводили в соответствии с ОФС.1.2.3.0015.15 «Комплексонометрическое титрование» [3]. Методика модифицирована с учетом специфики ЛФ – низкое содержание ионов цинка. Титрование проводилось натрия эдетата раствором 0,005 М, который готовился непосредственно перед титрованием, путем разведения 0,05 М раствора в 10 раз.

**Методика:** 1,0 г геля (точная навеска) растворяют в 10 мл воды очищенной, прибавляют 5 мл аммиачного буферного раствора, 0,01 г эриохрома черного Т (индикаторная смесь) и титруют натрия эдетата раствором 0,005 М до устойчивого синего окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия эдетата раствора 0,005 М соответствует 0,001857 г C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Zn.

Содержание аизола в геле рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{T \cdot (V - V_{\text{к.о.}}) \cdot K \cdot P}{a},$$

где X – содержание аизола в ЛФ, г; T – титр аизола по натрия эдетату раствору 0,005 М, г/мл; P – масса ЛФ (100,0 г); V – объем натрия эдетата раствора 0,005 М, пошедшего на определение, мл; V<sub>к.о.</sub> – объем натрия эдетата раствора 0,005 М, пошедшего на контрольный опыт, мл; K – коэффициент поправки к молярности титранта; a – масса навески ЛФ, г.

**Определение pH** водного раствора геля проводили потенциометрическим методом согласно ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия»[3].

Методика: 1,0 г геля растворяют в 50 мл воды очищенной, свободной от углерода диоксида, комнатной температуры, перемешивают и регистрируют pH водного раствора геля.

**Определение высыхаемости** геля проводили по методике (Г. П. Грядунова, 1968 г.): образцы помещают в специальные кюветы, заполненные до краев, избегая пустот. Излишки образцов удаляют шпателем, чтобы оставалась ровная поверхность испарения. Заполненные кюветы хранят при комнатной температуре и относительной влажности не более 60 ± 5 % в течение месяца, в месте, исключающем загрязнение. Взвешивание проводят ежедневно в течение первых 5-ти дней, далее взвешивают на 10-й, 15-й, 20-й, 2-й, 30-й дни от начала опыта. Проводят расчет убыли массы кюветы с гелем, которую выражают в процентах к первоначальному весу.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Помимо ЛС, важнейшим компонентом стоматологических гелей является гелеобразующая основа. Она активный носитель ЛС и должна соответствовать общим требованиям, предъявляемым к наружным стоматологическим ЛФ [5]. Поскольку АФС – ацизол является водорастворимым, для выбора основы использованы водорастворимые полимеры, которые обладают нейтральными вкусовыми качествами, и разрешены для применения в медицинской практике. В качестве гидрофильных полимеров для получения основы выбраны коммерчески доступные полимеры отечественного производства: МЦ-35, натрия альгинат, Na-КМЦ. Введение пластификаторов обеспечивает создание оптимальной пластичности и адгезивности, которые необходимы при применении гелей. Оптимальной комбинацией является пластификация водных растворов МЦ и Na – КМЦ с глицерином [6].

На первом этапе изучены основы по органолептическим показателям: однородность, отсутствие расслоения и комкования. Основы на МЦ-35 и Na-КМЦ оставались однородными, имели хорошую консистенцию и внешний вид. Основы с концентрацией глицерина 10 %, на МЦ-35 и Na-КМЦ с концентрацией от 4,0 до 4,5 % имели жидкую консистенцию. Основы на МЦ-35 и Na-КМЦ с концентрацией от 5 до 6 % обладали плотной структурой. Использование альгината натрия в виде основы не позволило количественно определить ацизол. Из изученных композиций выбрана основа на Na-КМЦ в концентрации 6 % пластифицированная глицерином 10 % отвечающая оптимальным органолептическим показателям.

Для проведения дальнейших исследований в отобранную основу введен ацизол. Благодаря исследованиям последних лет установлена эффективность при-

менения ацизола в стоматологии для профилактики и лечения кариеса. При аппликационном способе применения ацизол проявляет новые свойства, не описанные для этого препарата прежде, что обеспечивает расширение способов его применения, в том числе для лечения нарушений баланса макро- и микроэлементов различной этиологии [7].

Для снижения микробной контаминации нами выбраны консерванты нипагин и нипазол. Согласно литературным данным, наибольшей противомикробной активностью обладает смесь нипагина и нипазола соотношении 3:1. Именно при таком соотношении достигается более сильное консервирующее действие, кроме этого, при совместном применении двух или нескольких парабенов происходит комплементарное перекрывание их антимикробных спектров [8].

Завершающим этапом выбора оптимальной основы являлось определение степени высвобождения ДВ из геля кондуктометрическим методом [4].

Ранее проведенными экспериментальными исследованиями установлена зависимость значения удельной электропроводимости от концентрации ДВ. Готовилась серия стандартных растворов геля с различной концентрацией ацизола и определялась величина удельной электропроводимости. По полученным данным строился график в координатах: концентрация – удельная электропроводимость на котором наблюдается линейная зависимость (рисунок 1).

На следующем этапе с целью изучения степени высвобождения ацизола использовали кондуктометрический метод анализа как более быстрый и простой в исполнении. По экспериментальным данным построена кинетическая кривая высвобождения ацизола из геля. В условиях проводимого эксперимента сопротивление мембранны диффузионному

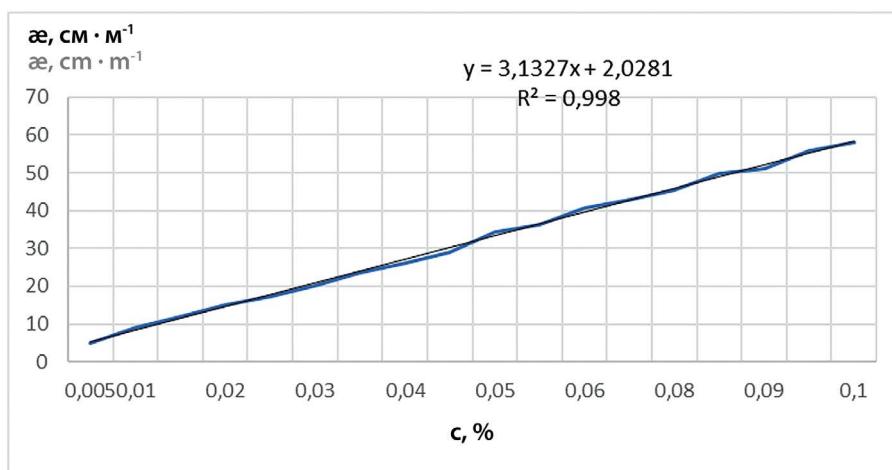


Рисунок 1. Зависимость удельной электропроводимости от концентрации ДВ

Figure 1. Dependence of electrical conductivity on drug concentration

потоку ЛС было равно нулю, ее функцию выполняла вода, что обеспечивало полное высвобождение ЛС (рисунок 2).

Из графика видно, что с увеличением времени значение удельной электропроводимости возрастает, т. е. количество высвобождаемых ионов в воде увеличивается. Таким образом, происходит постепенное высвобождение ацизола из геля. Выбранная основа не препятствует его выходу и в дальнейшем, при апликационном применении способна обеспечить длительное воздействие ЛС как на твердые ткани зуба, так и слизистую оболочку полости рта.

Таким образом, в результате поэтапного проведенных исследований, а также с учетом обоснования выбора АФС и вспомогательных веществ разработан следующий состав стоматологического геля (г): ацизола 0,1, Na-KМЦ 6,0, глицерина 10,0, нипагина 0,15, нипазола 0,05, воды очищенной до 100,0.

Изготовление геля проводили в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями с учетом последовательности введения компонентов и оптимальных условий гомогенизации.

На следующем этапе проведена стандартизация геля. В рамках стандартизации модифицированы и апробированы аналитические методики для определения ДВ. Для подтверждения подлинности ацизола использовали микрокристаллоскопическую реакцию на катион цинка с раствором щавелевой кислоты, обнаруживаемый минимум 5 мкг [2]. В результате реакции, постепенно по краю капли об-

разуются прозрачные кристаллы прямоугольной формы.

Количественное определение ацизола проводили комплексонометрическим методом. Методика апробирована на трех сериях геля. Полученные результаты статистически обработаны в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Для обработки были взяты 7 наиболее близких результатов. Результаты представлены в таблице 1 [3].

Как видно из представленных в таблице 1 данных, относительная ошибка среднего результата 1,43 %, доверительный интервал  $0,0976 \pm 0,0014$ , стандартное отклонение результата отдельного определения 0,00369 г. Полученные данные свидетельствуют о хорошей воспроизводимости методики и удовлетворительной точности. Модифицированные и апробированные методики в дальнейшем будут валидированы для составления НД на гель.

Определение pH водного раствора геля проводили потенциометрическим методом согласно ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» [3]. Данный показатель должен быть близок к pH слюны, что позволяет свести к минимуму возможность раздражающего действия ЛФ.

Результаты оценки качества геля на трех сериях представлены в таблице 2.

Полученные данные свидетельствуют о соответствии геля нормируемым требованиям. Установленные показатели и нормы качества включены в методиче-

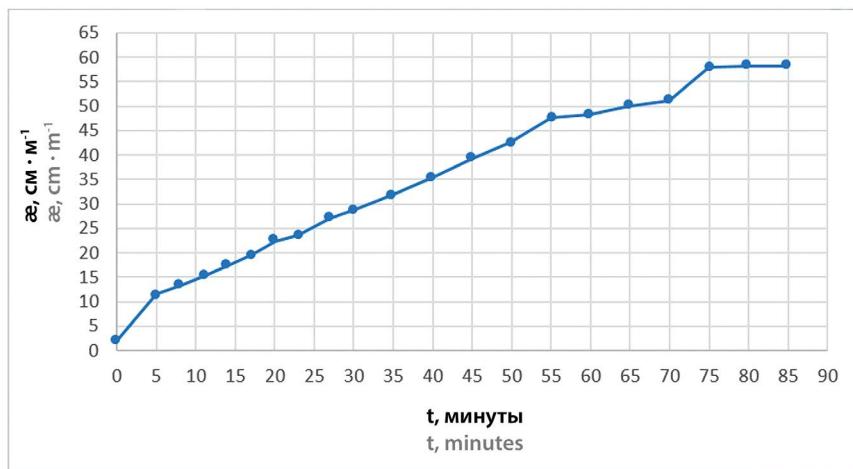


Рисунок 2. Кинетическая кривая высвобождения ацизола с кондуктометрическим контролем

Figure 2. Kinetic curve of acezol release with conductometric control

Таблица 1. Результаты комплексонометрического определения ацизола в геле

Table 1. The results of the complexometric determination of acyzol in gel

n	f	X	S <sup>2</sup>	S	P, %	t (P, f)	ΔX	ΔX	ε, %
7	6	0,0976	$1,36 \times 10^{-5}$	$3,69 \times 10^{-3}$	95	2,45	$3,42 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	1,43

**Таблица 2. Результаты стандартизации геля**

**Table 2. Results of gel standardization**

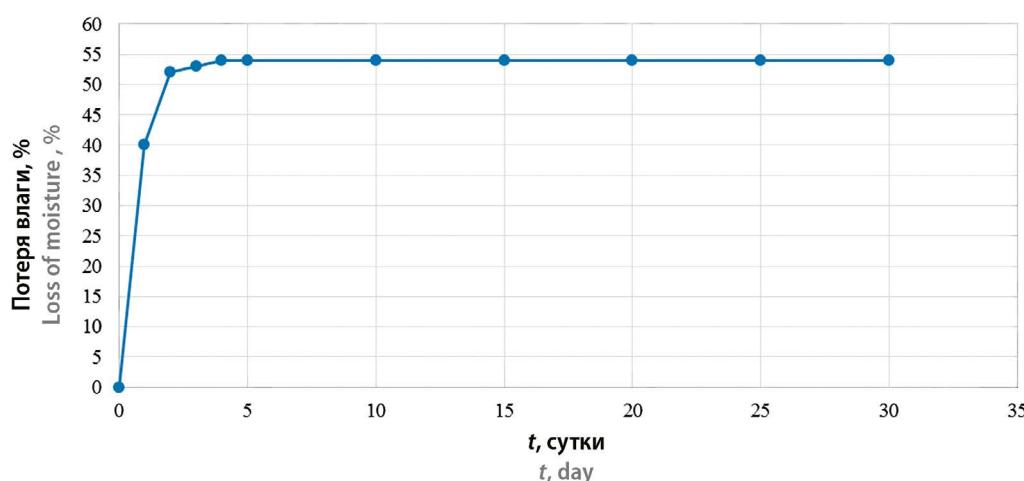
№ серии № series	Описание Description	pH	Подлинность (реакция с щавелевой кислотой) Length (reaction with oxalic acid)	Количественное определение, г (комплексонометрический метод) Quantitative definition, g (complexometric method)
<i>Нормируемые требования Standard requirements</i>				
	Белая опалесцирующая однородная гелеобразная масса, с характерным запахом ацизола White opalescent homogeneous gel-like mass with a characteristic acisol odor	6,5–7,5	образование прозрачных кристаллов прямоугольной формы formation of transparent crystals rectangular	0,10 ± 0,01
1	соответствует corresponds to	6,50 ± 0,05	соответствует corresponds to	0,09 ± 0,004
2	соответствует corresponds to	6,60 ± 0,05	соответствует corresponds to	0,10 ± 0,005
3	соответствует corresponds to	6,70 ± 0,05	соответствует corresponds to	0,10 ± 0,005

ские указания по изготовлению и контролю качества геля в условиях аптечных организаций.

При создании эффективных ЛФ, отвечающих современным медико-фармацевтическим требованиям, необходимо исследовать их стабильность в процессе хранения. Для определения стабильности гели хранились при температуре от 10 до 11 °C и относительной влажности воздуха не более 60 ± 5 % в широкогорлых банках. Исследование проводили на 3 сериях геля. Предварительные результаты показали стабильность физико-химических показателей и количественного содержания ацизола в гелях в течение 4-х месяцев.

С целью определения устойчивости геля к потере влаги при хранении, а также с целью выбора оптимального тароупаковочного материала проводили исследование высыхаемости в трех параллелях. Результаты представлены на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3 наибольшая потеря влаги происходит в первые пять дней – до 55 %, что связано с уменьшением водной фазы. В качестве тароупаковочного материала можно рекомендовать тубы пластиковые или алюминиевые с лаковым покрытием с пластмассовыми бушонами, так как данная упаковка минимизирует контакт с воздухом и как следствие снижает потерю водной фазы.



**Рисунок 3. Результаты определения высыхаемости стоматологического геля с ацизолом**

**Figure 3. The results of determining the dryness of a dental gel with acisol**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные поэтапные комплексные исследования показали перспективность разработки стоматологического геля с аизолом. Предложенные методы исследований могут быть рекомендованы к использованию для оценки качества геля в процессе изготовления и хранения, а также для включения в нормативную документацию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Голованенко А.Л. Обзор реминерализующих лекарственных средств применяющихся для профилактики и лечения начального кариеса эмали. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018;2:37–43.
2. Живописцев В.П., Селезнева Е.А. Аналитическая химия цинка. М: Наука; 1975. 200 с.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЕМБ; 2018; 1815 с.
4. Рюмина Т.Е., Голованенко А.Л. Изучение влияния наиболее значимых биофармацевтических факторов на высвобождение ЛС из геля для реминерализации дентина. *Фундаментальные исследования*. 2013;6(1):116–119.
5. Соловская А.В., Сампьев А.М., Никифорова Е.Б. Актуальные вопросы номенклатуры, состава и технологии стоматологических гелей. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;1.
6. Сливкин А.И. Фармацевтическая технология. Высокомолекулярные соединения в фармации и медицине. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2017. 560 с.

7. Бабаниязова З.Х., Бабаниязов Х.Х., Радионов И.А., Скальный А.В., Бобр И.С. Аизол в решении проблем цинкдефицитных состояний. *Микроэлементы в медицине*. 2010;11(1):25–30.
8. Беликов О.Е., Пучкова Т.В. Консерванты в косметике и средствах гигиены. М.: Школа косметических химиков; 2003. 250 с.

## REFERENCES

1. Golovanenko A. L. An overview of reminiscent medications used for the prevention and treatment of initial enamel caries. *Pacific Medical Journal*. 2018;2:37–43. (In Russ.)
2. Zhivopiscev V. P., Selezneva E. A. Analytical chemistry of zinc. Moscow: Nauka; 1975. 200 p. (In Russ.)
3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V 1. Moscow: FEMB; 2018; 1815 p. (In Russ.)
4. Ryumina T. E., Golovanenko A. L. Study of the influence of the most significant biopharmaceutical factors on the release of drugs from the gel for dentin remineralization. *Fundamental research*. 2013;6(1):116–119. (In Russ.)
5. Sopovskaya A. V., Sampiev A. M., Nikiforova E. B. Topical issues of nomenclature, composition and technology of dental gels. *Current problems of science and education*. 2015;1. (In Russ.)
6. Clivkin A. I. Pharmaceutical technology. High-molecular compounds in pharmacy and medicine. Moscow: GEOTAP-Media; 2017. 560 p. (In Russ.)
7. Babanijazova Z. H., Babanijazov H. H., Radionov I. A., Skal'nyj A. V., Bobr I. S. *Traceelements in medicine*. 2010;11(1):25–30. (In Russ.)
8. Belikov O. E., Puchkova T. V. Preservatives in cosmetics and hygiene products. Moscow: SHkola kosmeticheskikh himikov; 2003. 250 p. (In Russ.)

XXII



ПЛАТИНОВАЯ  
УНЦИЯ

ВСЕРОССИЙСКИЙ ОТКРЫТЫЙ КОНКУРС  
ПРОФЕССИОНАЛОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

# 20 АПРЕЛЯ 2023 ПЛАТИНОВАЯ УНЦИЯ'22

Первый этап конкурса – 14 ноября 2022 – 10 февраля 2023

ПОДАТЬ ЗАЯВКУ

**WWW.UNCIA.RU**



ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ



IMS Health & Quintiles are now  
**IQVIA**™



Фармацевтический  
ВЕСТНИК



Исполнительная  
дирекция конкурса



Организаторы  
церемонии награждения



РЕКЛАМА



**Оригинальная статья / Research article**

## Разработка методики количественного определения генистеина для аттестации стандартного образца

**А. А. Жигалина<sup>✉</sup>, О. Ю. Стрелова, А. Н. Гребенюк**

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Жигалина Анна Анатольевна. E-mail: zhigalina.anna@spcpu.ru

ORCID: A. A. Жигалина – <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>; О. Ю. Стрелова – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; А. Н. Гребенюк – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 03.11.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Одно из актуальных направлений развития современной фармации – поиск новых высокоеффективных фармацевтических субстанций с широким спектром фармакологического действия и низкой токсичностью. В результате проведенных рядом авторов исследований были показаны положительные результаты применения генистеина для профилактики и при терапии сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза у женщин в период менопаузы. Он проявляет гипохолестеринемическое и антидиабетическое действие, а также радиозащитные свойства. Была проведена сравнительная оценка генистеина из жмыха семян сои культурной [*Glycine max* (L.) Merr.] и синтезированного ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА и кафедре ХТЛВ, СПХФУ. Исследования природного генистеина методом ГХ-МС показало наличие в образце примесь родственного изофлавона – дайдзенин. Синтезированный генистейн был оценен по показателям качественного анализа.

**Цель.** Цель нашего исследования являлось разработка методики количественного определения генистеина для его аттестации в качестве стандартного образца.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлся генистейн 96 %, (abcr. Gute Chemie, Германия). Количественное определение методом неводного титрования проводили на pH-метре лабораторном F20 (METTLER TOLEDO, США) в среде диметилформамида (ДМФА) х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия). Исследование методом ВЭЖХ выполняли на высокоеффективном жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония).

**Результаты и обсуждение.** За основу разработки методики количественного определения генистеина использовали рекомендованную ГФ РФ XIV издания метод неводного титрования в среде ДМФА, титрант 0,1 М раствора гидроксида натрия. Конечная точка титрования (КТТ) устанавливалась с помощью индикатора тимолового синего. Однако была отмечена сложность в визуальной фиксации изменением окраски индикатора. Было предложено использовать потенциометрическое определение конечной точки титрования. Для количественного определения генистеина в БАВ и лекарственных средствах предложена методика ВЭЖХ.

**Заключение.** Разработана методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде ДМФА. Интегральная кривая потенциометрического титрования не обладает достаточной информативностью. Поэтому рекомендуется строить дифференциальную кривую титрования для определения конечной точки титрования. Валидационная оценка полученных результатов показала, что методика является правильной (RSD, % = 1,25), сходимой (RSD, % = 1,21) и внутрилабораторно прецизионной (в первый день RSD, % = 1,21, во второй день RSD, % = 1,41).

**Ключевые слова:** генистейн, стандартный образец, неводное титрование

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

**Вклад авторов.** А. А. Жигалина и О. Ю. Стрелова апридумали и разработали эксперимент. А. А. Жигалина, О. Ю. Стрелова, А. Н. Гребенюк участвовали в обработке данных, написании текста статьи и в обсуждении результатов.

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

**Для цитирования:** Жигалина А. А., Стрелова О. Ю., Гребенюк А. Н. Разработка методики количественного определения генистеина для аттестации стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4):202–208. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-202-208>

## Development of a Method for the Quantitative Determination of Genistein for the Certification of a Certified Reference Material

**Anna A. Zhigalina<sup>✉</sup>, Olga Yu. Strelova, Alexander N. Grebenyuk**

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Anna A. Zhigalina. E-mail: zhigalina.anna@spcpu.ru

ORCID: Anna A. Zhigalina – <https://orcid.org/0000-0002-2881-8707>; Olga Yu. Strelova – <https://orcid.org/0000-0001-6737-1023>; Alexander N. Grebenyuk – <https://orcid.org/0000-0002-9381-194X>.

Received: 06.09.2022

Revised: 03.11.2022

Published: 25.11.2022

© Жигалина А. А., Стрелова О. Ю., Гребенюк А. Н., 2022  
© Zhigalina A. A., Strelova O. Yu., Grebenyuk A. N., 2022

## Abstract

**Introduction.** One of the priority directions in the development of modern pharmacy is the search for new highly effective pharmaceutical substances with a high spectrum of pharmacological action and low toxicity. As a result of studies conducted by a number of authors, positive results have been shown for the use of genistein for the prevention and treatment of cardiovascular diseases and osteoporosis in menopausal women. It exhibits hypocholesterolemic and antidiabetic effects, as well as radioprotective properties. A comparative evaluation of genistein from soybean seed cake [*Glycine max* (L.) Merr.] and synthesized by SPC "Pharmzashchita" and the department of chemical technology of medicinal substances, SPCPU was carried out. Studies of natural genistein by GC-MS showed the presence of an admixture of a related isoflavone, daidzein, in the sample. The synthesized genistein was assessed in terms of qualitative analysis.

**Aim.** The aim of our study was to develop a method for the quantitative determination of genistein for its certification as a CRM.

**Materials and methods.** The object of the study was 96 % genistein (abbr. Gute Chemie, Германия). Quantitative determination by non-aqueous titration was carried out on a laboratory pH meter F20 (METTLER TOLEDO, USA) in a reagent grade DMFA medium (JSC "EKOS-1", Russia). The HPLC study was carried out on an Agilent 1200 Series high-performance liquid chromatograph LC-20 Prominence (Shimadzu, Japan).

**Results and discussion.** The method of non-aqueous titration in DMFA medium which recommended by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition, titrant 0.1 M sodium hydroxide solution, was used as the basis for the development of a method for the quantitative determination of genistein. The end point of the titration was set using thymol blue indicator. However, the difficulty in visual fixation by changing the color of the indicator was noted. It has been proposed to use a potentiometric end-point determination. For the quantitative determination of genistein in dietary supplements and drugs containing this substance a HPLC method was proposed.

**Conclusion.** A method for non-aqueous titration of genistein with potentiometric end-point determination in DMFA medium has been developed. The integral curve is not very informative for a clear definition of the titration end point. It is recommended to use a differential curve. The validation evaluation of the obtained results showed that the method is trueness (RSD, % = 1.25), precision (RSD, % = 1.21) and intermediate precision (on the first day of RSD, % = 1.21, on the second day of RSD, % = 1.41).

**Keywords:** genistein, certified reference material, non-aqueous titration

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

**Contribution of the authors.** Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova planned and carried out the experiment. Anna A. Zhigalina, Olga Yu. Strelova and Alexander N. Grebenyuk conducted data processing, discussion of the results, 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:** Zhigalina A. A., Strelova O. Yu., Grebenyuk A. N. Development of a method for the quantitative determination of genistein for the certification of a certified reference material. *Drug development & registration.* 2022;11(4):202-208. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-202-208>

## ВВЕДЕНИЕ

Одно из актуальных направлений развития современной фармации – поиск новых высокоэффективных фармацевтических субстанций с широким спектром фармакологического действия и низкой токсичностью. Большой интерес, в связи с этим, представляют вещества природного происхождения, в частности генистин. В результате проведенных рядом авторов исследований было показано, что генистин оказывает положительное действие для профилактики и при терапии сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза у женщин в период менопаузы, проявляет гипохолестеринемическое, антидиабетическое действие и антитромбоцитарную активность [1–4]. В проведенных ранее исследованиях были обнаружены его радиозащитные свойства, которые максимальны при его введении до облучения. Показана возможность создания на его основе лекарственного препарата для сопровождения лучевой терапии опухолей [5, 6].

Препараты на основе сои содержат в своем составе комплекс изофлавонов, и при маркировке некоторых биологически активных добавок (БАД) не указывают, какие изофлавоны включены, указывается только суммарное количество. Отсутствие аттестованного отечественного стандартного образца генистина затрудняет проведение процедуры оценки качества БАД или лекарственных средств на основе генистина. Применение стандартных образцов (СО) обеспечивает метрологическую сопоставимость и совместимость результатов любого анализа, в том числе фармацевтического [7, 8].

В проведенной нами ранее работе была выполнена сравнительная оценка генистина из жмыха семян сои культурной [*Glycine max* (L.) Merr.] и синтезированного ФГУП НПЦ «Фармзашита» ФМБА и кафедре химической технологии лекарственных веществ, СПХФУ [9, 10]. Исследования природного генистина методом ГХ-МС показали наличие в образце примесей родственного изофлавона – дайдзеин [6]. Синтезированный генистин был оценен его показатели качест-

ва. Было подтверждено его химическое строение и определены спектральные характеристики методами ЯМР, ИК и рамановской спектроскопии, полученные данные могут быть использованы в нормативной документации для аттестации генистеина как СО [10].

Таким образом, синтетический метод получения генистеина предпочтителен для разработки СО и его дальнейшей аттестации.

**Целью нашего исследования** являлось разработка методики количественного определения генистеина для его аттестации в качестве СО.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся генистейн 96 %, (abcr. Gute Chemie, Германия). В качестве титранта использовали натрия гидроксид, ч.д.а. (ООО «Вектор», Россия), в качестве растворителя была использована смесь бензола, х.ч. (ГОСТ 5955-75, АО «ЭКОС-1», Россия) и метанола, х.ч. (ГОСТ 6995-77, АО «ВЕКТОН», Россия), для среды титрования был использован диметилформамид (ДМФА), х.ч., (АО «ЭКОС-1», Россия), индикатором служил тимоловый синий, ч.д.а. (ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Количественное определение проводили на pH-метре лабораторном F20 (METTLER TOLEDO, США) в среде ДМФА.

### Приготовление титранта 0,1 M раствора гидроксида натрия

0,4 г натрия гидроксида растворяют в 10 мл метанола, далее попеременно добавляют бензоль и метанол так, чтобы соотношение было 1:4, не допуская расслаивания раствора [11].

### Стандартизация 0,1 M раствора гидроксида натрия

10 мл свежеперегнанный ДМФА вносят в плоскодонную колбу на 100 мл, добавляют 2 капли индикатора тимолового синего, и титруют 0,1 M раствором гидроксида натрия до перехода окраски в синий цвет, устанавливают объем титранта, пошедшего на нейтрализацию. Далее бюретку снова заполняют до нулевой отметки. Отвешивают около 0,05 г бензойной кислоты (точная навеска) и вносят в ту же колбу для титрования, перемешивают до растворения и вновь титруют тем же 0,1 M раствором натрия гидроксида до перехода окраски в синий цвет. Для расчета концентрации берут объем титранта, пошедшего только на бензойную кислоту. Расчет ведут в соответствии с ГФ РФ XIV издания [11].

### Методика количественного определения генистеина методом неводного титрования с предварительной нейтрализацией ДМФА

10 мл ДМФА вносят в мерный стакан на 50 мл, добавляют 2 капли индикатора тимолового синего и титруют 0,1 M раствором гидроксида натрия до перехода

окраски в синий цвет с использованием магнитной мешалки. Далее бюретку снова заполняют до нулевой отметки. Отвешивают около 0,05 г генистеина (точная навеска) и вносят мерный стакан на 50 мл, перемешивают до растворения, устанавливают электрохимическую ячейку так, чтобы электроды были полностью в растворе, ожидают, когда на приборе установится равновесие и титруют тем же титрантом при непрерывном перемешивании. Каждый раз при добавлении определенного объема титранта ожидали установления равновесия в ячейке для записи показаний прибора. Для расчета концентрации берут объем титранта, пошедшего только на генистейн (таблица 1).

**Таблица 1. Результаты неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования**

**Table 1. Results of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration**

Номер образца Sample number	C, %
1	97,2
2	97,82
3	97,88
4	98,27
5	98,66
6	99,29
7	100,28
8	100,76

Для определения БАВ на основе генистеина была разработана методика количественное определение методом ВЭЖХ.

Около 0,02 г (точная навеска) генистеина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 50 мл метаноле (HPLC for Gradient Analysis, CAS № 75-05-8, США) и доводят объем раствора до метки и перемешивают. Хроматографируют испытуемый раствор и определяют площадь пика исследуемого образца. Определение проводили в режиме изократического элюирования, при этом использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостный хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), снабженный диодно-матричным детектором (УФ-детектор модель SPD-M20A). Неподвижная фаза – колонка C18 из нержавеющей стали (25,0 см × 4,6 мм), заполненная октадецилискликагелем зернением 5 мкм. Подвижная фаза – ацетонитрил (HPLC for Gradient Analysis, CAS № 75-05-8, Thermo Fisher Scientific, США), и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты. Условия хроматографирования: скорость потока – 0,5 мл/мин; температура термостата колонки – 400 °C; длина волны детектирования – 264 нм; объем пробы – 10 мкл; время анализа – 20 мин [12, 13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из подходов к количественному определению вещества как стандартного образца является использование абсолютного метода, такого как титри-

метрия. Данный метод необходим для включения в нормативную документацию по показателю «Количественное определение». Это относительно быстрый метод, позволяет оценивать содержание с большой точности и не требует наличие СО. Генистейн по своей природе изофлавон, который не растворим в воде, и является очень слабой кислотой. Исходя из этих особенностей его свойств, было выбрано неводное титрование с потенциометрическим определением конечной точки титрования. Неводное титрование флавоноидов рекомендуется проводить в среде диметилформамида, точку эквивалентности устанавливают по индикатору или потенциометрически. Так, в частности, для количественного определения субстанции рутозида в ГФ РФ XIV издания предложен метод неводного титрования в среде ДМФА, титрант 0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида, с потенциометрической точкой определения конца титрования [11].

В начале нашего исследования конечная точка титрования (КТТ) устанавливалась с помощью индикатора тимолового синего. Однако была отмечена сложность в визуальной фиксации изменением окраски индикатора: генистейн очень слабая кислота ( $pK_{a1} = 7,63$ ;  $pK_{a2} = 9,67$ ;  $pK_{a3} = 10,80$ ), резкого изменения pH в растворе при титровании не происходит, поэтому сложно установить, до какой окраски индикатора необходимо титровать.

Было предложено использовать потенциометрическое определение конечной точки титрования. При проведении титрования с контрольным опытом были обнаружены скачки на кривых титрования, так как среда ДМФА влияет на ход титрования, для нивелирования данных скачков было предложено титровать с предварительной нейтрализацией ДМФА без контрольного опыта.

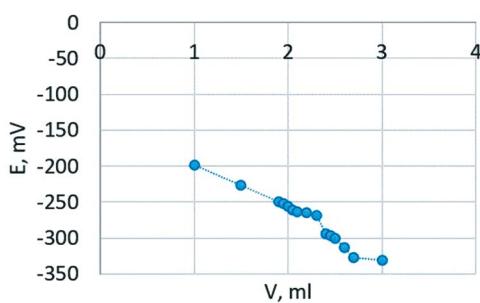


Рисунок 1. Общий вид интегральной кривой титрования генистейна

Figure 1. General view of the integral titration curve of genistein

По результатам титрования построены интегральные и дифференциальные кривые (рисунки 1 и 2).

Как видно из представленного рисунка 1, при титровании скачок изменения потенциала ( $E$ , мВ) нечеткий, поэтому интегральная кривая является ма-

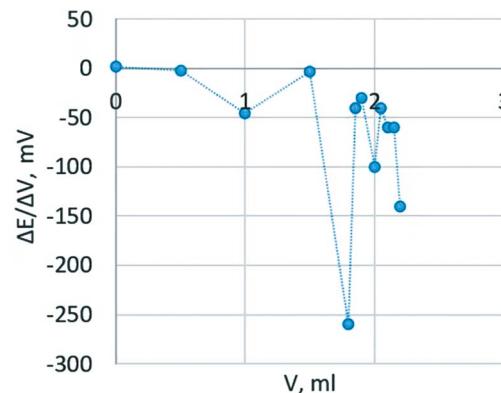


Рисунок 2. Общий вид дифференциальной кривой титрования генистейна

Figure 2. General view of the differential titration curve of genistein

лоинформативной для определения КТТ. Рекомендуется строить дифференциальную кривую (рисунок 2).

Статистическая обработка данных (таблица 2) была проведена в соответствии с ГФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента». Методика была валидирована в соответствии с ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по показателям правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности [11, 14, 15]. Все выборки были проверены на нормальное распределение и был сделан вывод, что массив аналитических данных близок к нормальному, поэтому все расчеты проводились параметрическими методами. Среднее и медиана приблизительно равны. Экспесс по модулю меньше 1, коэффициент асимметрии по модулю меньше 0,5, что в пределах нормы.

Проведена статистическая обработка данных, полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Статистическая обработка данных результатов неводного титрования генистейна с потенциометрическим определением КТТ

Table 2. Statistical processing of data from the results of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of final point of titration

Метрологические характеристики Metrological characteristics							
$\bar{X}$	$P$	$f(n - 1)$	$S$	$S^2$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$\epsilon, \%$	RSD, %
98,8	95 %	7	1,25	1,56	1,04	1,06	1,26

После проведения статистической обработки данных содержание вещества составило  $98,8 \% \pm 1,04$ .

Оценку правильности методики подтвердили результатами анализа модельных растворов, результаты представлены в таблице 3 и 4.

Критерием оценки при определении правильности служило рассчитанное значение коэффициента вариации, которое, согласно международным требованиям, должно быть не более 2 % [11].

**Таблица 3. Оценка правильности методики неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением КТТ**

**Table 3. Evaluation of the correctness of the method of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration**

Номер образца Sample number	Введено, г Entered, g	Найдено, г Found, g	Коэффициент открываемости, % Open Rate, %
1	0,0505	0,0506	100,20
2	0,0521	0,0506	97,12
3	0,0503	0,0491	97,61
4	0,0517	0,0520	100,58
5	0,0506	0,0495	97,83
6	0,0504	0,0495	98,21
7	0,0502	0,0495	98,61
8	0,0511	0,0507	99,22

**Таблица 4. Статистическая обработка данных по оценке правильности методики неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением КТТ**

**Table 4. Statistical processing of data on the assessment of the correctness of the method of non-aqueous titration of genistein with potentiometric determination of the end point of the titration**

Метрологические характеристики Metrological characteristics							
$\bar{X}$	P	$f(n - 1)$	S	$S^2$	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$	$\epsilon, \%$	RSD, %
98,7	95 %	7	1,24	1,53	1,04	1,05	1,25

Сходимость методики оценивалась по результатам анализа четырех отдельно приготовленных растворов, соответствующих 100 % рабочей концентрации генистеина из одного образца субстанции при одинаковых условиях проведения анализа (таблица 5). Согласно требованиям, значение коэффициента вариации при оценке сходимости должно быть не более 2,0 %. Согласно таблице 5 методика характеризуется удовлетворительной сходимостью. Значение коэффициента вариации составило 1,21 %, что менее 2 % [11].

Промежуточная прецизионность методики оценивалась при проведении анализов в разные дни и с использованием другой посуды (таблица 6). Согласно установленным требованиям, критерием оценки промежуточной прецизионности методики является коэффициента вариации, при оценке промежуточной прецизионности должно быть не более 2,0 % [11].

Согласно таблице 5 методика характеризуется удовлетворительной промежуточной прецизионностью.

При проведении ВЭЖХ была определена линейность методики на 5 модельных растворах разной концентрации генистеина, построен график линейной зависимости (рисунок 3). Значение коэффици-

ента корреляции составляет 0,9981, что отвечает условию критерия приемлемости (не менее 0,99) [11, 17]. На рисунке 4 показана хроматограмма генистеина (0,0805 мг/мл), время удерживание составило 11,59 мин.

**Таблица 5. Оценка сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения генистеина**

**Table 5. Evaluation of the accuracy and intermediate precision of the method for the quantitative determination of genistein**

Масса навески генистеина в 1 день, г Mass of genistein in 1 day, g	Объем титранта, мл Titrant volume, ml		Масса навески генистеина во 2 день, г Mass of genistein in 2 day, g
	1 день 1 day	2 день 2 day	
0,0506	2,05	1,8	0,0498
0,0504	2,05	1,75	0,0505
0,0502	2,05	1,75	0,0501
0,0511	2,1	1,75	0,0496
$\bar{X}$	2,1	1,8	$\bar{X}$
S	0,025	0,025	S
RSD, %	1,21	1,41	RSD, %
$\bar{X} \pm \Delta \bar{X} (P = 95\%)$	0,0398	0,040	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X} (P = 95\%)$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была разработана методика неводного титрования генистеина с потенциометрическим определением конечной точки титрования в среде ДМФА. Установлено, что интегральная кривая потенциометрического титрования не обладает достаточной информативностью, так как она не позволяет определить скачок потенциала. Поэтому рекомендуется строить дифференциальную кривую титрования для определения конечной точки титрования. Валидационная оценка полученных результатов показала, что методика является правильной (RSD, % = 1,25), сходимой (RSD, % = 1,21) и внутрилабораторно прецизионной (в первый день RSD, % = 1,21, во второй день RSD, % = 1,41).

Определено, что методика неводного титрования с индикатором не позволяет получить корректные результаты, так визуально сложно установить конечную точку титрования из-за нечеткого изменения окраски.

Была разработана методика ВЭЖХ количественного определения генистеина для дальнейшего исследования БАД и лекарственных препаратов на его основе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зверев Я.Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):181–194. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.

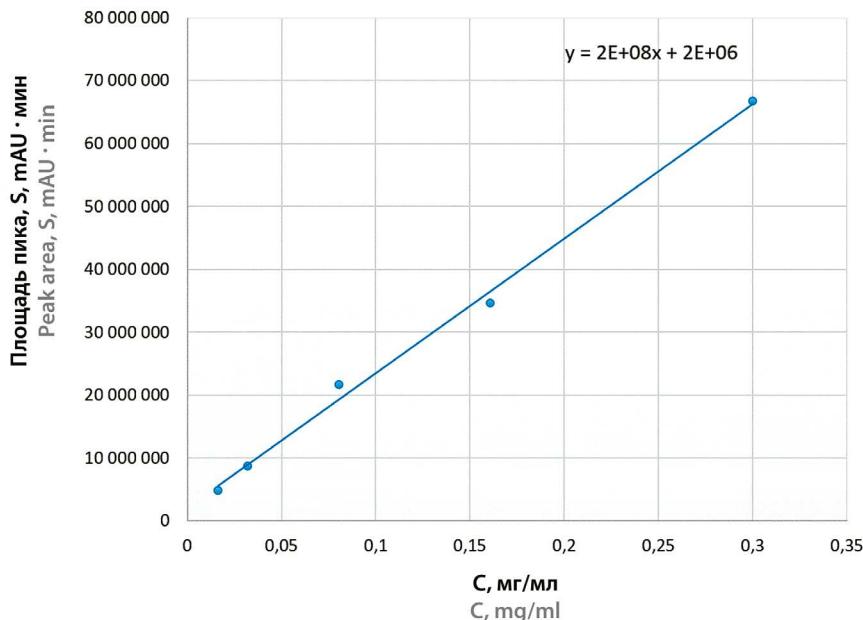


Рисунок 3. График линейность зависимости площади пика (S) от концентрации раствора генистеина

Figure 3. Graph of the linearity dependence of the peak area (S) on the concentration of the genistein solution

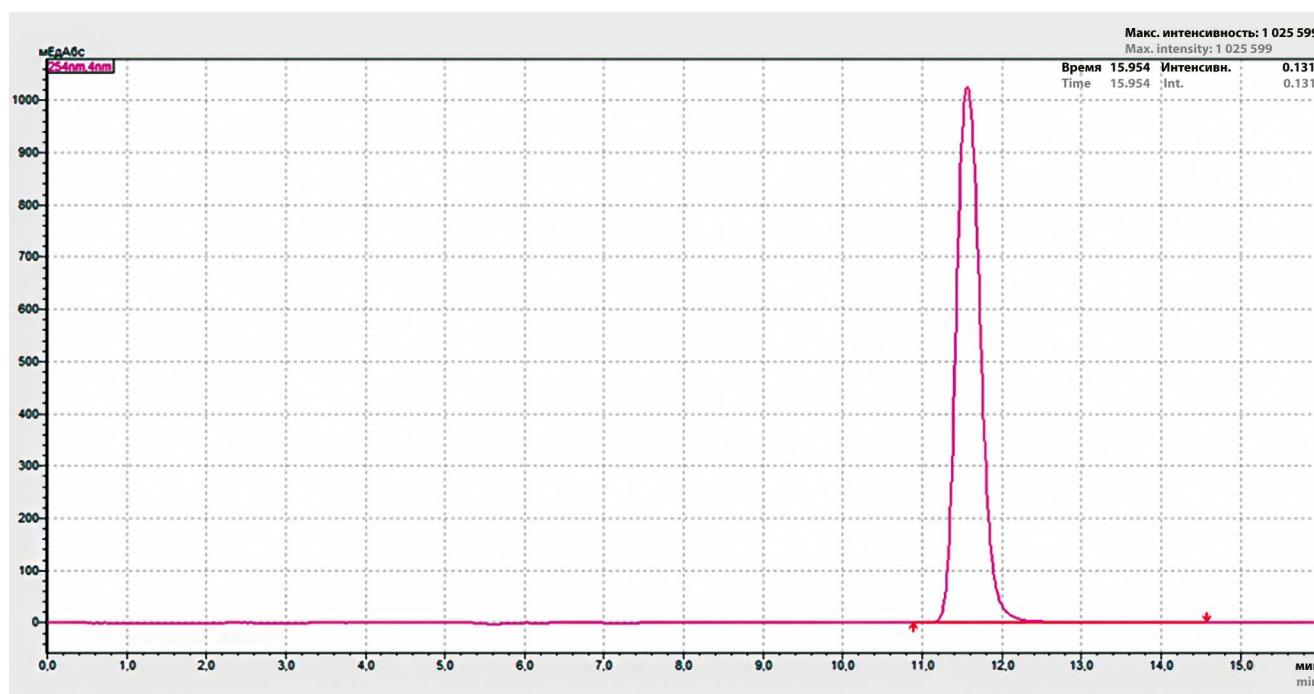


Рисунок 4. ВЭЖХ-хроматограмма генистеина (0,0805 мг/мл)

Figure 4. HPLC chromatogram of genistein (0.0805 mg/ml)

2. Thangavel P, Puga-Olguín A., Rodríguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):1–17. DOI: 10.3390/molecules24213892.
3. Garbiec E., Cielecka-Piontek J., Kowalówka M., Hołubiec M., Zalewski P. Genistein – opportunities related to an interesting molecule of natural origin. *Molecules*. 2022;27(3):1–22. DOI: 10.3390/molecules27030815.
4. Yamagata K., Yamori Y. Potential effects of soy isoflavones on the prevention of metabolic syndrome. *Molecules*. 2021;26(19):1–20. DOI: 10.3390/molecules26195863.
5. Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badruddeen, Ahsan F. An Overview on Genistein and its Various Formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
6. Стрелова О. Ю., Волкова К. В., Гребенюк А. Н., Теслов Л. С. Оценка показателей качества перспективной фармацевтической

- субстанции на основе синтетического генистеина. *Бутлеровские сообщения*. 2016;48(12):94–101.
- 7. Леонтьев Д. А., Подружников Ю. В., Воловик Н. В. Роль стандартных образцов в обеспечении качества лекарственных средств: регуляторные и метрологические аспекты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;3(16):180–188.
  - 8. Щепочкина О. Ю., Гегечкори В. И., Прокофьева В. И., Чепило Д. А., Левко А. А., Чадова Н. Н., Шестаков В. Н. Современные подходы к разработке стандартных образцов лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(7):49–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.
  - 9. Чикунов И. Е. Отчет о научно-исследовательской работе по теме Генистеин. Химки: ФМБА НПЦ «ФАРМЗАЩИТА»; 2012. 22 с.
  - 10. Жигалина А. А., Дударев В. Г., Тихонова В. В., Стрелова О. Ю. Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):20–31. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31.
  - 11. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ; 2018. 1814 с.
  - 12. Нгуен К. Б., Абышев А. З. Валидация методик количественного определения субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2H-1-дibenзопиран-2,2'-диона. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):59–65. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-59-65.
  - 13. Кутовая А. М., Давыдова В. Н., Перова И. Б., Эллер К. И. Определение профиля флавоноидов в гипогликемическом сбре методом высокоеффективной жидкостной хроматографии. *Тонкие химические технологии*. 2020;15(3):39–46. DOI: 10.32362/2410-6593-2020-15-3-39-46.
  - 14. Старчак Ю. А., Гаврилин М. В., Шинева Н. В. Трансфер аналитических методик (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):182–187. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187.
  - 15. Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
  - 16. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

## REFERENCE

- 1. Zverev Ya. F. Antitumor activity of flavonoids. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):181–194. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
- 2. Thangavel P., Puga-Olguín A., Rodríguez-Landa J. F., Zepeda R. C. Genistein as potential therapeutic candidate for menopausal symptoms and other related diseases. *Molecules*. 2019;24(21):1–17. DOI: 10.3390/molecules24213892.
- 3. Garbiec E., Cielecka-Piontek J., Kowalówka M., Hołubiec M., Zalewski P. Genistein – opportunities related to an interesting molecule of natural origin. *Molecules*. 2022;27(3):1–22. DOI: 10.3390/molecules27030815.
- 4. Yamagata K., Yamori Y. Potential effects of soy isoflavones on the prevention of metabolic syndrome. *Molecules*. 2021;26(19):1–20. DOI: 10.3390/molecules26195863.
- 5. Jaiswal N., Akhtar J., Singh S. P., Badruddeen, Ahsan F. An Overview on Genistein and its Various Formulations. *Drug Research*. 2019;69(06):305–313. DOI: 10.1055/a-0797-3657.
- 6. Strelova O. Ju., Volkova K. V., Grebenjuk A. N., Teslov L. S. Assessment of quality indicators of a promising pharmaceutical substance based on synthetic genistein. *Butlerovskie soobshchenija*. 2016;48(12):94–101. (In Russ.)
- 7. Leont'ev D. A., Podpruzhnikov Ju. V., Volovik N. V. The role of reference standards in quality assurance for medicines: regulatory and metrological aspects. *Drug development & registration*. 2016;3(16):180–188. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-209-215>  
УДК 615.014.21



Оригинальная статья / Research article

## Разработка и валидация методики определения подлинности рамиприла в экструдате и напечатанных таблетках

В. В. Тихонова, О. А. Терентьева<sup>✉</sup>, К. А. Гусев, Е. В. Флисюк, Д. Н. Маймистов

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Терентьева Оксана Андреевна. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

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

Статья поступила: 06.09.2022      Статья принята в печать: 07.11.2022      Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Трехмерная печать за последнее десятилетие показала свою пригодность в качестве технологии получения лекарственных средств. Однако отсутствие регламентированных методов контроля качества готовых напечатанных лекарственных препаратов накладывает ограничение на повсеместное использование методов трехмерной печати в фармацевтической практике. Таким образом, разработка методов анализа напечатанных лекарственных форм представляет интерес в фармацевтической разработке.

**Цель.** Разработать специфичную методику определения рамиприла в экструдате и напечатанных таблетках методом ВЭЖХ.

**Материалы и методы.** Субстанция: рамиприл. Вспомогательные вещества: Kollidon® VA 64, Kollidon® CL-F, полиэтиленгликоль-1500, натрия карбонат, Poloxamer-188, натрия стеарил фумарат. Реактивы: хлористоводородная кислота х.ч., ацетонитрил для ультра-ВЭЖХ, натрия октансульфонат для ВЭЖХ, кислота ортофосфорная 85 %, натрия перхлорат ч.д.а., триэтиламин. Стандартный образец рамиприла USP (№ 1598303).

**Результаты и обсуждение.** Разработана специфичная методика определения рамиприла в составе филаментов и напечатанных таблеток методом ВЭЖХ в присутствии ион-парного реагента (октансульфоната натрия).

**Заключение.** Предполагается адаптировать разработанную методику хроматографирования для определения кинетики высвобождения рамиприла из напечатанных твердых лекарственных форм, а также для определения количественного содержания рамиприла в них.

**Ключевые слова:** специфичность, рамиприл, ВЭЖХ, напечатанные лекарственные формы, трехмерная печать

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

**Вклад авторов.** В. В. Тихонова разрабатывала методику идентификации рамиприла в филаментах и таблетках. О. А. Терентьева, К. А. Гусев реализовывали получение филаментов и таблеток рамиприла. Все авторы обрабатывали полученные данные, участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России. Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-874.2022.4.

**Для цитирования:** Тихонова В. В., Терентьева О. А., Гусев К. А., Флисюк Е. В., Маймистов Д. Н. Разработка и валидация методики определения подлинности рамиприла в экструдате и напечатанных таблетках. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):209–215. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-209-215>

## Development and Validation of HPLC Method for Identification of Ramipril in Printed Tablets and Filaments

Viktoria V. Tihonova, Oksana A. Terenteva<sup>✉</sup>, Konstantin A. Gusev, Elena V. Flisyuk, Denis N. Maimistov

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Oksana A. Terenteva. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

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

Received: 06.09.2022      Revised: 07.11.2022      Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** 3D printing has shown its usefulness as a drug manufacturing technology over the past decade. However, the lack of regulated methods for quality control of finished printed drugs imposes a limitation on the widespread use of 3D printing methods in pharmaceutical practice. Thus, the development of methods for the analysis of printed dosage forms is of interest in pharmaceutical development.

© Тихонова В. В., Терентьева О. А., Гусев К. А., Флисюк Е. В., Маймистов Д. Н., 2022  
© Tihonova V. V., Terenteva O. A., Gusev K. A., Flisyuk E. V., Maimistov D. N., 2022

**Aim.** To develop a specific method for the determination of ramipril in filaments and printlets by HPLC.

**Materials and methods.** Substance: ramipril. Excipients: Kollidon® VA 64, Kollidon® CL-F, PEG-1500, sodium carbonate anhydrous, Poloxamer-188, sodium stearyl fumarate. Reagents: hydrochloric acid, acetonitrile for ultra-HPLC, sodium octanesulfonate for HPLC, orthophosphoric acid 85 %, sodium perchlorate analytical grade, triethylamine. Standard: ramipril USP (No 1598303).

**Results and discussion.** A special HPLC method in accordance with an ion-pair reagent (sodium octanesulfonate) for the determination of ramipril in the composition of filaments and printlets was proposed.

**Conclusion.** The developed chromatographic method should be adapted for ramipril release determination. This method can be used to quantify ramipril in further studies.

**Keywords:** specificity, ramipril, HPLC, printed dosage forms, 3D printing

**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.** Viktoria V. Tihonova developed a method for identifying ramipril in filaments and printlets. Oksana A. Terenteva and Konstantin A. Gusev realized the production of filaments and printlets of ramipril. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

**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. The study was supported by the grant of the President of the Russian Federation for the state support of young Russian scientists – candidates of sciences MK-874.2022.4.

**For citation:** Tihonova V. V., Terenteva O. A., Gusev K. A., Flisyuk E. V., Maimistov D. N. Development and validation of HPLC method for identification of ramipril in printed tablets and filaments. *Drug development & registration.* 2022;11(4):209–215. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-209-215>

## ВВЕДЕНИЕ

Трехмерная печать представляет собой инновационный метод быстрого прототипирования для производства твердых лекарственных форм, интерес к которому неуклонно растет в течение последних 15 лет [1–6]. Такой вид печати позволяет создавать индивидуальные лекарственные формы с модифицированным высвобождением послойным методом [7–8]. Данный метод производства оказался важным инструментом в области исследований и разработок, сокращая временные и стоимостные затраты на ранней стадии разработки концепции производства [9].

Одним из способов создания твердых лекарственных форм является метод послойного наплавления (FDM-печать) [10–12], представляющий собой технологию трехмерной печати, в процессе которой создается трехмерный объект заданной геометрической формы последовательным осаждением и затвердеванием слоев из расплавленных/размягченных термопластичных материалов [13]. Такая методика обладает огромным потенциалом для производства препаратов и медицинских изделий и в настоящее время проводится большое количество исследований, о чем можно судить по возросшей публикационной активности в этой области и количеству зарегистрированных патентов. Данный метод позволяет получить лекарственные формы, содержащие строго заданное количество и распределение действующего вещества, определенного размера, формы, геометрии и плотности, которые могут быть изменены, что соответствует

потребностям персонализированной медицины. Исходные материалы обычно поставляются в виде филаментов, которые производятся методом экструзии горячего расплава [14–19]. Ограничения применения данной технологии в фармацевтической области связаны с дефицитом филаментов, состоящих из материалов пригодных для медицинского применения.

Однако разнообразие активных молекул, их свойств, и отсутствие регламентированных методов контроля качества готовых напечатанных лекарственных препаратов накладывает ограничение на повсеместное использование методов трехмерной печати в фармацевтической практике.

Таким образом, разработка методов анализа печатных лекарственных форм представляет интерес в фармацевтической разработке. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является одним из самых информативных и часто применяемых в фармацевтическом анализе методом. Разработка оптимальных параметров хроматографирования, включая разработку методики и условий для идентификации и обнаружения веществ в инновационных лекарственных формах и их полупродуктах (экструдате), является актуальной задачей.

В данном исследовании в качестве объектов исследования были выбраны филаменты, полученные методом экструзии горячего расплава, или экструдат, и таблетки, напечатанные методом послойного наплавления [20]. В качестве модельного вещества был выбран рамиприл. Рамиприл является гипотензивным и вазодилатирующим лекарственным препаратом, ме-

ханизм действия которого заключается в угнетении активности ангиотензинпревращающего фермента. Назначается пациентам с артериальной гипертензией и в качестве компонента комбинированной терапии хронической сердечной недостаточности. По химическому строению рамиприл представляет собой производное гетероциклической карбоновой кислоты (рисунок 1).

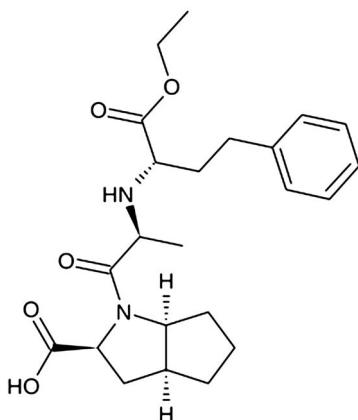


Рисунок 1. Структурная формула рамиприла

Figure 1. Chemical structure of ramipril

Таким образом, целью работы было разработать специфичную методику определения подлинности рамиприла в экструдате и напечатанных таблетках методом ВЭЖХ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция: рамиприл (ЗАО «Активный компонент», Россия). Вспомогательные вещества: сополимер поливинилпирролидона и винилацетата Kollidon® VA 64 (BASF, Германия); кросповидон Kollidon® CL-F (BASF, Германия); полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1500 (Merck, Германия); натрия карбонат безводный  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Dr. Paul Lohmann®, Германия); полоксамер Poloxamer-188 (Merck, Германия); натрия стеарил фумарат Alubra™ PG-100 (Fmc Biopolymer AS, Норвегия). Реактивы: хлористоводородная кислота х.ч. (АО «КА-УСТИК», Россия); ацетонитрил для ультра-ВЭЖХ (J.T. Baker, Нидерланды); натрия октансульфонат для ВЭЖХ (Panreac, Испания); кислота ортоfosфорная 85 % LiChropur® (Merck, Германия); натрия перхлорат ч.д.а. (Sigma-Aldrich, США); триэтиламин (Biochem Chemopharma, Франция). Стандартный образец рамиприла USP (№ 1598303).

**Оборудование.** Хроматограф жидкостной LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), детектор диодно-матричный, хроматографическая колонка Shim-pack Ve-lox 250 мм × 5  $\mu\text{m}$ . Ультразвуковая ванна «Сапфир» (Россия). Весы лабораторные CE224-C (ООО «Сартогосм», Россия).

В качестве стандарта была использована субстанция рамиприла, имеющая паспорт качества производителя. С целью определения пригодности хроматографической системы была приготовлена подвижная фаза, состоящая из буферного раствора и ацетонитрила в соотношении 450:550. Буферный раствор представлял собой 0,1 % раствор октансульфоната натрия с  $\text{pH} = 2,4 \pm 0,1$  (коррекция  $\text{pH}$  осуществлялась ортофосфорной кислотой).

**Испытуемый раствор.** Точную навеску субстанции, экструдата, таблеток, соответствующую около 10 мг рамиприла, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл подвижной фазы, обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин до полного растворения при комнатной температуре и доводили объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивали и фильтровали, отбрасывая первые порции фильтрата.

**Раствор стандартного образца рамиприла.** Около 10 мг (точная навеска) стандартного образца рамиприла помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в подвижной фазе и доводили объем раствора ей же до метки.

**Режим хроматографирования.** Скорость потока 0,5 мл/мин, режим элюирования изократический. Температура термостата 25 °C. Объем пробы 20 мкл. Время хроматографирования 20 минут. Длина волны детекции 210 нм.

Анализировали последовательно 5 проб растворов субстанции рамиприла и объектов исследования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

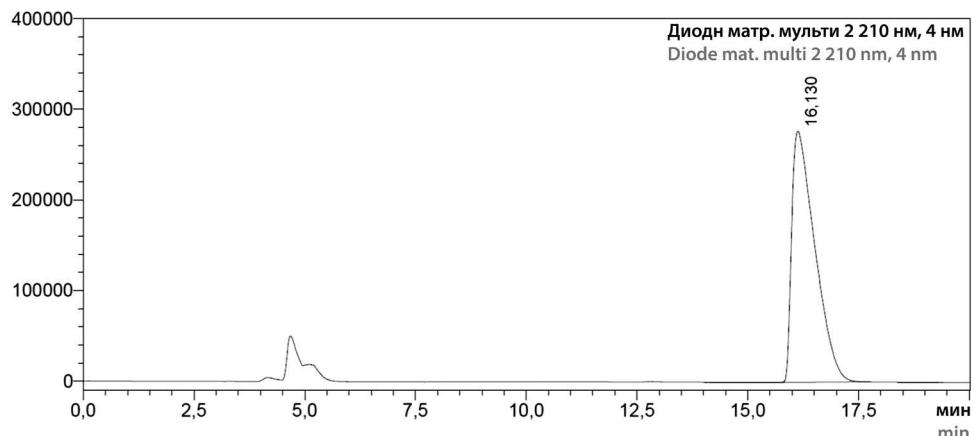
В качестве объектов анализа были выбраны фильтры и таблетки рамиприла, напечатанные методом послойного наплавления. Фильтры были получены экструзией расплава из смеси вспомогательных веществ и рамиприла [20]. Таблетки из полученных фильтров были напечатаны со степенью заполнения 100 % диаметром 10 мм. В состав фильтров и таблеток входили рамиприл, сополимер поливинилпирролидона и винилацетата Kollidon® VA 64, полиэтиленгликоль-1500, натрия карбонат, полоксамер-188, натрия стеарил фумарат и кросповидон Kollidon® CL-F.

Хроматографирование субстанции рамиприла проводили в соответствии с методикой, описанной выше. Полученные по результатам анализа параметры представлены в таблице 1.

Приведенные в таблице данные свидетельствуют о пригодности хроматографической системы для идентификации субстанции рамиприла.

Рисунок 2 демонстрирует типичную хроматограмму субстанции рамиприла, использованной в анализе.

Для того, чтобы оценить воспроизводимость результатов анализа, описанных для субстанции рамиприла, на фильтрах, брали отрезки 5 фильтров, содержащих 3 % рамиприла по массе, растворяли их в подвижной фазе при воздействии ультразвука в те-



**Рисунок 2. Типичная хроматограмма субстанции рамиприла**

**Figure 2. Characteristic chromatogram of the ramipril substance**

чение 10 минут. Время удерживания рамиприла по результатам анализа составляло порядка 16,7 мин, вид типичной хроматограммы филаментов рамиприла представлен на рисунке 3.

Полученные растворы хроматографировали в описанных выше условиях 5 раз, результаты анализа представлены в таблице 2.

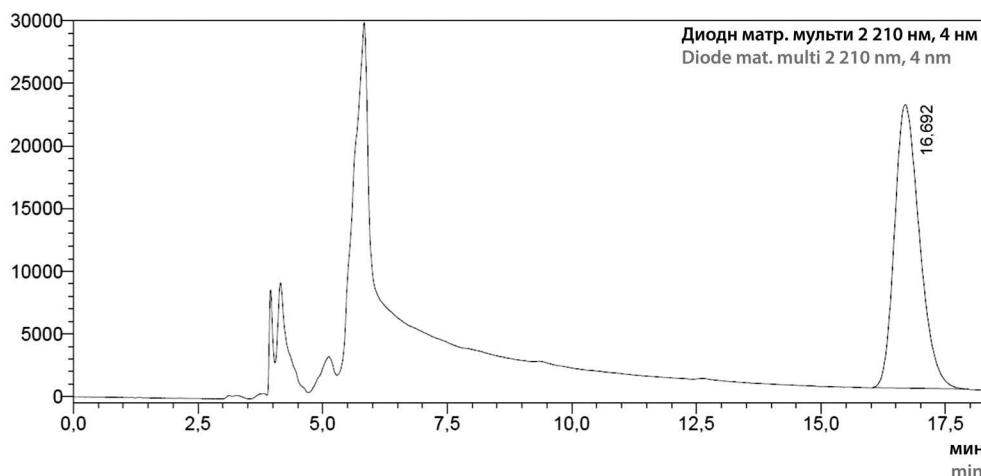
Данные таблицы 2 свидетельствуют о возможности применения методики анализа субстанции рамиприла для исследования качественного состава филаментов на его основе.

С целью оценки возможности применения описанной ранее методики анализа для напечатанных таблеток рамиприла был произведен анализ 5 таблеток. Каждую таблетку растворяли в подвижной фазе и полученный раствор после фильтрования вводили в инжектор хроматографа. На рисунке 4 представлен вид типичной хроматограммы напечатанной таблетки. Полученные в ходе анализа параметры представлены в таблице 3.

**Таблица 1. Хроматографические параметры субстанции рамиприла**

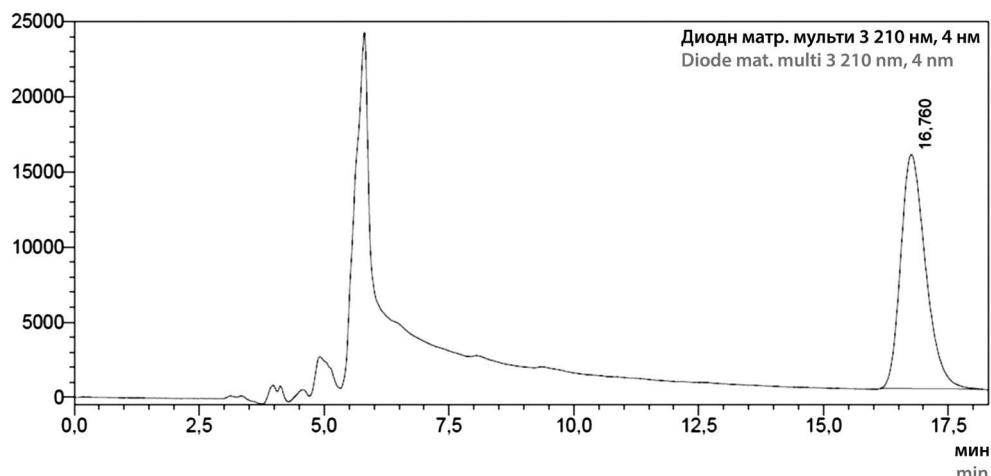
**Table 1. Chromatographic parameters of the ramipril substance**

№ опыта Experiment number	Время удерживания пика рамиприл (RT), МИН Retention time of ramipril peak, min	Эффективность (N) Column efficiency	Фактор асимметрии (T) Asymmetry factor
1	16,130	60875	2,00
2	16,126		
3	16,034		
4	15,975		
5	15,890		
Среднее значение Average	16,031		
Относительное стандартное отклонение (Sr), % Relative standard deviation	0,34		



**Рисунок 3. Типичная хроматограмма филаментов рамиприла**

**Figure 3. Characteristic chromatogram of the ramipril filaments**



**Рисунок 4. Типичная хроматограмма напечатанной таблетки рамиприла**

**Figure 4. Characteristic chromatogram of the ramipril printets**

**Таблица 2. Хроматографические параметры филаментов рамиприла**

**Table 2. Chromatographic parameters of the ramipril filaments**

№ опыта Experiment number	Время удерживания пика рамиприла (RT), мин Retention time of ramipril peak, min	Эффективность (N) Column efficiency	Фактор асимметрии (T) Asymmetry factor
1	16,685	66016	1,30
2	16,692		
3	16,693		
4	16,702		
5	16,699		
Среднее значение Average	16,694		
Относительное стандартное отклонение (Sr), % Relative standard deviation	0,04		

Важным этапом разработки методик идентификации является доказательство их специфичности. Для этих целей были приготовлены экструдат-плацебо и таблетки-плацебо, и проведен их анализ в описанных выше условиях. На хроматограммах филаментов и таблеток в области пика рамиприла (16,7 мин) отсутствуют какие-либо аналитические сигналы (рисунок 5).

Таким образом, разработана специфичная методика, позволяющая идентифицировать рамиприл в составе экструдата и напечатанных таблеток. Предложено использование ультразвуковой ванны для более полного перехода рамиприла в раствор из экструдата и таблеток, так как он обладает низкой растворимостью в воде и относится ко II классу БКС.

**Таблица 3. Хроматографические параметры напечатанных таблеток рамиприла**

**Table 3. Chromatographic parameters of the ramipril printets**

№ опыта Experiment number	Время удерживания пика рамиприла (RT), мин Retention time of ramipril peak, min	Эффективность (N) Column efficiency	Фактор асимметрии (T) Asymmetry factor
1	16,737	66572	1,30
2	16,811		
3	16,760		
4	16,754		
5	16,760		
Среднее значение Average	16,764		
Относительное стандартное отклонение (Sr), % Relative standard deviation	0,17		

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания требует проведения теста растворения для контроля качества полученных таблеток, предполагается адаптировать разработанную методику хроматографирования для определения кинетики высвобождения рамиприла из напечатанных твердых лекарственных форм, а также для определения количественного содержания рамиприла в них.

Данную методику можно предлагать для использования в качестве основы для разработки методик идентификации других сходных по строению лекарственных веществ.

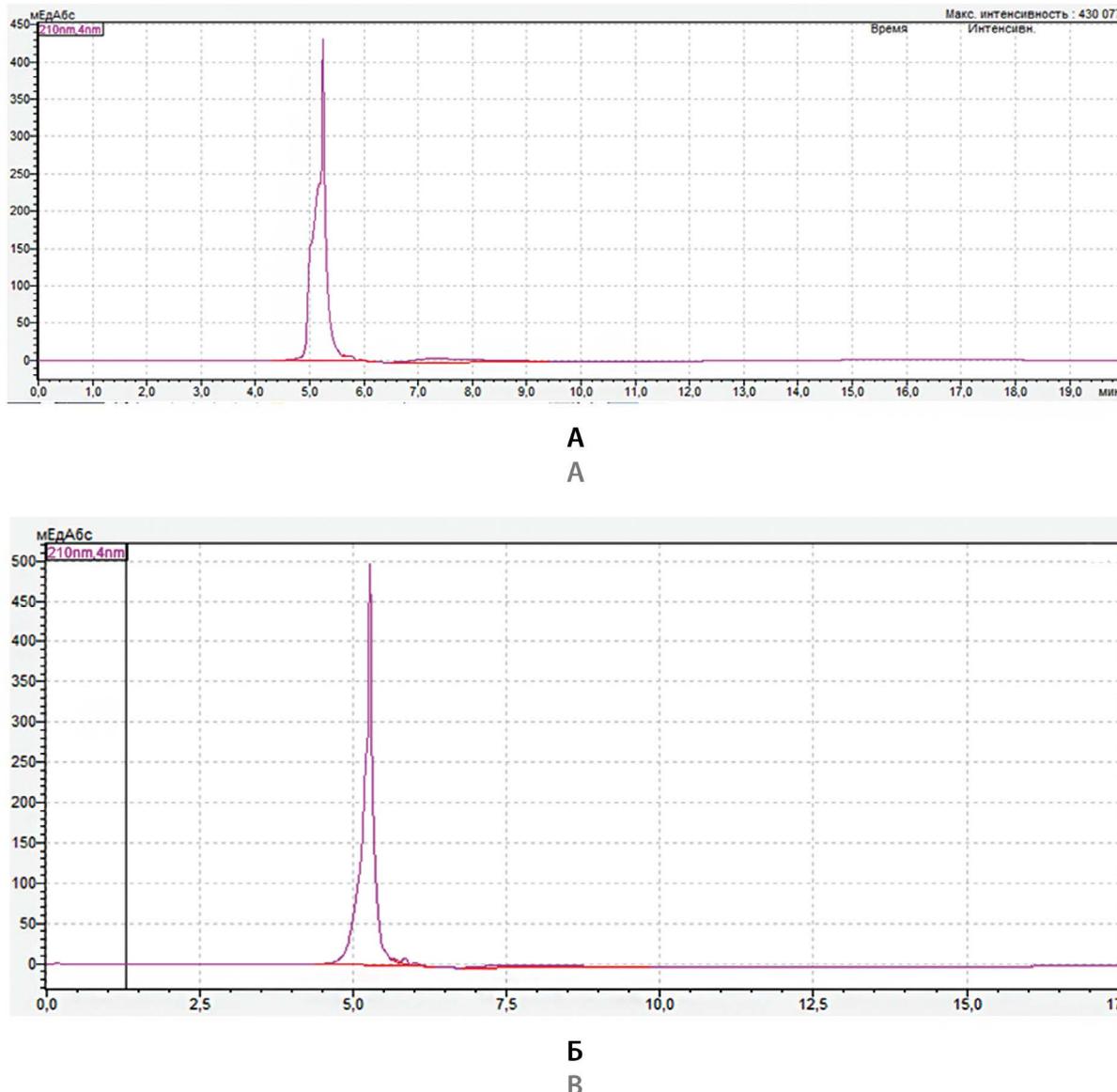


Рисунок 5. Хроматограмма:

А – плацебо-филамента рамиприла; Б – плацебо-таблетки рамиприла

Figure 5. Chromatogram:

A – ramipril placebo-filament; B – ramipril placebo-tablet

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zema L., Melocchi A., Maroni A., Gazzaniga A. Three-Dimensional Printing of Medicinal Products and the Challenge of Personalized Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;106(7):1697–1705. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.021.
2. Norman J., Madurawe R. D., Moore C. M. V., Khan M. A., Khairuzzaman A. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;108:39–50. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.001.
3. Zhu X., Li H., Huang L., Zhang M., Fan W., Cui L. 3D printing promotes the development of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110644. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110644.
4. Afsana, Jain V., Haider N., Jain K. 3D Printing in Personalized Drug Delivery. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(42):5062–5071. DOI: 10.2174/1381612825666190215122208.
5. Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing pharmaceuticals: drug development to frontline care. *Trends in pharmacological sciences*. 2018;39(5):440–451. DOI: 10.1016/j.tips.2018.02.006.
6. Annereau M., Toussaint B., Wojcicki A. D., Dufaÿ, Salmeron R. D., Boudy V. 2D-3D printing in hospital pharmacies, what roles and challenges? *Annales pharmaceutiques françaises*. 2021;79(4):361–374. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.01.002.
7. Desu P. K., Maddiboyina B., Vanitha K., Gudhanti S. N. K. R., Anusha R., Jhawat V. 3D Printing Technology in Pharmaceutical Dosage Forms: Advantages and Challenges. *Current Drug Targets*. 2021;22(16):1901–1914. DOI: 10.2174/1389450122666210120142416.
8. Johannesson J., Khan J., Hubert M., Teleki A., Bergström C. A. S. 3D-printing of solid lipid tablets from emulsion gels. *International journal of pharmaceutics*. 2021;597:120304. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120304.

9. Goole J., Amighi K. 3D printing in pharmaceutics: A new tool for designing customized drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*. 2016;499(1–2):376–394. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.071.
10. Kafle A., Luis E., Silwal R., Pan H. M., Shrestha P. L., Bastola A. K. 3D/4D Printing of Polymers: Fused Deposition Modelling (FDM), Selective Laser Sintering (SLS), and Stereolithography (SLA). *Polymers (Basel)*. 2021;13(18):3101. DOI: 10.3390/polym13183101.
11. Tan D. K., Maniruzzaman M., Nokhodchi A. Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2018;10(4):203. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040203.
12. Arany P., Papp I., Zichar M., Regdon G., Béres M., Szalóki M., Kovács R., Fehér P., Ujhelyi Z., Vecsernyés M., Bácskay I. Manufacturing and Examination of Vaginal Drug Delivery System by FDM 3D Printing. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1714. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101714.
13. Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Terent'eva O. A., Semin A. A. Additive manufacturing technologies for pharmaceutics. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;51(11):1025–1029. DOI: 10.1007/s11094-018-1733-5.
14. Melocchi A., Parietti F., Maroni A., Foppoli A., Gazzaniga A., Zema L. Hot-melt extruded filaments based on pharmaceutical grade polymers for 3D printing by fused deposition modeling. *International journal of pharmaceutics*. 2016;509(1–2):255–263. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.036.
15. Carlier E., Marquette S., Peerboom C., Amighi K., Goole J. Development of mAb-loaded 3D-printed (FDM) implantable devices based on PLGA. *International journal of pharmaceutics*. 2021;597:120337. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120337.
16. Viidik L., Vesala J., Laitinen R., Korhonen O., Ketolainen J., Aruväli J., Kirsimäe K., Kogermann K., Heinämäki J., Laidmäe I., Ervashti T. Preparation and characterization of hot-melt extruded polycaprolactone-based filaments intended for 3D-printing of tablets. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2021;158:105619. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105619.
17. Nashed N., Lam M., Nokhodchi A. A comprehensive overview of extended release oral dosage forms manufactured through hot melt extrusion and its combination with 3D printing. *International journal of pharmaceutics*. 2021;596:120237. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120237.
18. Deshkar S., Rathi M., Zambad S., Gandhi K. Hot Melt Extrusion and its Application in 3D Printing of Pharmaceuticals. *Current Drug Delivery*. 2021;18(4):387–407. DOI: 10.2174/1567201817999201110193655.
19. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В. Технологии трехмерной печати для производства лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3(24):10–19.
20. Терентьева О. А., Гусев К. А., Тихонова В. В., Маймистов Д. Н., Шандрюк Г. А., Флисюк Е. В. Печать таблеток рамиприла методом послойного наплавления. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10-4(1):79–87. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87.
5. Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing pharmaceuticals: drug development to frontline care. *Trends in pharmacological sciences*. 2018;39(5):440–451. DOI: 10.1016/j.tips.2018.02.006.
6. Annereau M., Toussaint B., Wojcicki A. D., Dufaÿ, Salmeron R. D., Boudy V. 2D-3D printing in hospital pharmacies, what roles and challenges? *Annales pharmaceutiques françaises*. 2021;79(4):361–374. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.01.002.
7. Desu P. K., Maddiboyina B., Vanitha K., Gudhanti S. N. K. R., Anusha R., Jhawat V. 3D Printing Technology in Pharmaceutical Dosage Forms: Advantages and Challenges. *Current Drug Targets*. 2021;22(16):1901–1914. DOI: 10.2174/1389450122666210120142416.
8. Johannesson J., Khan J., Hubert M., Teleki A., Bergström C. A. S. 3D-printing of solid lipid tablets from emulsion gels. *International journal of pharmaceutics*. 2021;597:120304. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120304.
9. Goole J., Amighi K. 3D printing in pharmaceutics: A new tool for designing customized drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*. 2016;499(1–2):376–394. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.071.
10. Kafle A., Luis E., Silwal R., Pan H. M., Shrestha P. L., Bastola A. K. 3D/4D Printing of Polymers: Fused Deposition Modelling (FDM), Selective Laser Sintering (SLS), and Stereolithography (SLA). *Polymers (Basel)*. 2021;13(18):3101. DOI: 10.3390/polym13183101.
11. Tan D. K., Maniruzzaman M., Nokhodchi A. Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2018;10(4):203. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040203.
12. Arany P., Papp I., Zichar M., Regdon G., Béres M., Szalóki M., Kovács R., Fehér P., Ujhelyi Z., Vecsernyés M., Bácskay I. Manufacturing and Examination of Vaginal Drug Delivery System by FDM 3D Printing. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1714. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101714.
13. Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Terent'eva O. A., Semin A. A. Additive manufacturing technologies for pharmaceutics. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;51(11):1025–1029. DOI: 10.1007/s11094-018-1733-5.
14. Melocchi A., Parietti F., Maroni A., Foppoli A., Gazzaniga A., Zema L. Hot-melt extruded filaments based on pharmaceutical grade polymers for 3D printing by fused deposition modeling. *International journal of pharmaceutics*. 2016;509(1–2):255–263. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.036.
15. Carlier E., Marquette S., Peerboom C., Amighi K., Goole J. Development of mAb-loaded 3D-printed (FDM) implantable devices based on PLGA. *International journal of pharmaceutics*. 2021;597:120337. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120337.
16. Viidik L., Vesala J., Laitinen R., Korhonen O., Ketolainen J., Aruväli J., Kirsimäe K., Kogermann K., Heinämäki J., Laidmäe I., Ervashti T. Preparation and characterization of hot-melt extruded polycaprolactone-based filaments intended for 3D-printing of tablets. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2021;158:105619. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105619.
17. Nashed N., Lam M., Nokhodchi A. A comprehensive overview of extended release oral dosage forms manufactured through hot melt extrusion and its combination with 3D printing. *International journal of pharmaceutics*. 2021;596:120237. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120237.
18. Deshkar S., Rathi M., Zambad S., Gandhi K. Hot Melt Extrusion and its Application in 3D Printing of Pharmaceuticals. *Current Drug Delivery*. 2021;18(4):387–407. DOI: 10.2174/1567201817999201110193655.
19. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В. Three-dimensional printing technology for the production of dosage forms. *Drug development & registration*. 2018;3(24):10–19. (In Russ.)
20. Терентьева О. А., Гусев К. А., Тихонова В. В., Маймистов Д. Н., Шандрюк Г. А., Флисюк Е. В. Three-dimensional printing of ramipril tablets by fused deposition modeling. *Drug development & registration*. 2021;10-4(1):79–87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87.

## REFERENCES

1. Zema L., Melocchi A., Maroni A., Gazzaniga A. Three-Dimensional Printing of Medicinal Products and the Challenge of Personalized Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;106(7):1697–1705. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.021.
2. Norman J., Madurawe R. D., Moore C. M. V., Khan M. A., Khairuzzaman A. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;108:39–50. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.001.
3. Zhu X., Li H., Huang L., Zhang M., Fan W., Cui L. 3D printing promotes the development of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110644. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110644.
4. Afsana, Jain V., Haider N., Jain K. 3D Printing in Personalized Drug Delivery. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(42):5062–5071. DOI: 10.2174/1381612825666190215122208.
1. Zema L., Melocchi A., Maroni A., Gazzaniga A. Three-Dimensional Printing of Medicinal Products and the Challenge of Personalized Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;106(7):1697–1705. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.021.
2. Norman J., Madurawe R. D., Moore C. M. V., Khan M. A., Khairuzzaman A. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;108:39–50. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.001.
3. Zhu X., Li H., Huang L., Zhang M., Fan W., Cui L. 3D printing promotes the development of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110644. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110644.
4. Afsana, Jain V., Haider N., Jain K. 3D Printing in Personalized Drug Delivery. *Current pharmaceutical design*. 2018;24(42):5062–5071. DOI: 10.2174/1381612825666190215122208.
5. Trenfield S. J., Awad A., Goyanes A., Gaisford S., Basit A. W. 3D printing pharmaceuticals: drug development to frontline care. *Trends in pharmacological sciences*. 2018;39(5):440–451. DOI: 10.1016/j.tips.2018.02.006.
6. Annereau M., Toussaint B., Wojcicki A. D., Dufaÿ, Salmeron R. D., Boudy V. 2D-3D printing in hospital pharmacies, what roles and challenges? *Annales pharmaceutiques françaises*. 2021;79(4):361–374. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.01.002.
7. Desu P. K., Maddiboyina B., Vanitha K., Gudhanti S. N. K. R., Anusha R., Jhawat V. 3D Printing Technology in Pharmaceutical Dosage Forms: Advantages and Challenges. *Current Drug Targets*. 2021;22(16):1901–1914. DOI: 10.2174/1389450122666210120142416.
8. Johannesson J., Khan J., Hubert M., Teleki A., Bergström C. A. S. 3D-printing of solid lipid tablets from emulsion gels. *International journal of pharmaceutics*. 2021;597:120304. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120304.
9. Goole J., Amighi K. 3D printing in pharmaceutics: A new tool for designing customized drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*. 2016;499(1–2):376–394. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.071.
10. Kafle A., Luis E., Silwal R., Pan H. M., Shrestha P. L., Bastola A. K. 3D/4D Printing of Polymers: Fused Deposition Modelling (FDM), Selective Laser Sintering (SLS), and Stereolithography (SLA). *Polymers (Basel)*. 2021;13(18):3101. DOI: 10.3390/polym13183101.
11. Tan D. K., Maniruzzaman M., Nokhodchi A. Advanced Pharmaceutical Applications of Hot-Melt Extrusion Coupled with Fused Deposition Modelling (FDM) 3D Printing for Personalised Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2018;10(4):203. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040203.
12. Arany P., Papp I., Zichar M., Regdon G., Béres M., Szalóki M., Kovács R., Fehér P., Ujhelyi Z., Vecsernyés M., Bácskay I. Manufacturing and Examination of Vaginal Drug Delivery System by FDM 3D Printing. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1714. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101714.
13. Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Terent'eva O. A., Semin A. A. Additive manufacturing technologies for pharmaceutics. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;51(11):1025–1029. DOI: 10.1007/s11094-018-1733-5.
14. Melocchi A., Parietti F., Maroni A., Foppoli A., Gazzaniga A., Zema L. Hot-melt extruded filaments based on pharmaceutical grade polymers for 3D printing by fused deposition modeling. *International journal of pharmaceutics*. 2016;509(1–2):255–263. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.036.
15. Carlier E., Marquette S., Peerboom C., Amighi K., Goole J. Development of mAb-loaded 3D-printed (FDM) implantable devices based on PLGA. *International journal of pharmaceutics*. 2021;597:120337. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120337.
16. Viidik L., Vesala J., Laitinen R., Korhonen O., Ketolainen J., Aruväli J., Kirsimäe K., Kogermann K., Heinämäki J., Laidmäe I., Ervashti T. Preparation and characterization of hot-melt extruded polycaprolactone-based filaments intended for 3D-printing of tablets. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2021;158:105619. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105619.
17. Nashed N., Lam M., Nokhodchi A. A comprehensive overview of extended release oral dosage forms manufactured through hot melt extrusion and its combination with 3D printing. *International journal of pharmaceutics*. 2021;596:120237. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120237.
18. Deshkar S., Rathi M., Zambad S., Gandhi K. Hot Melt Extrusion and its Application in 3D Printing of Pharmaceuticals. *Current Drug Delivery*. 2021;18(4):387–407. DOI: 10.2174/1567201817999201110193655.
19. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В. Технологии трехмерной печати для производства лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3(24):10–19. (In Russ.)
20. Терентьева О. А., Гусев К. А., Тихонова В. В., Маймистов Д. Н., Шандрюк Г. А., Флисюк Е. В. Печать таблеток рамиприла методом послойного наплавления. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10-4(1):79–87. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87.



## Выделение, идентификация и количественное определение антраценпроизводных методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации

А. М. Полуянов<sup>1,2</sup>✉, А. Ю. Соколова<sup>2</sup>, Е. А. Малашенко<sup>1,2</sup>, Е. В. Сергунова<sup>2</sup>,  
Н. В. Бобкова<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, 119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

✉ Контактное лицо: Полуянов Андрей Михайлович. E-mail: a.poluyanov@cpha.ru

ORCID: А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>; А. Ю. Соколова – <https://orcid.org/0000-0002-7500-5880>; Е. А. Малашенко – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>; Е. В. Сергунова – <https://orcid.org/0000-0002-7194-5525>; Н. В. Бобкова – <https://orcid.org/0000-0003-1591-4019>.

Статья поступила: 06.10.2022      Статья принята в печать: 00.11.2022      Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Создание новых высокоеффективных лекарственных препаратов требует тщательного изучения метаболома растительного сырья и проведения сравнительного фитохимического изучения подземных органов, повсеместно распространенных на территории России близкородственных видов Щавелей, таких как: Щ. курчавый, Щ. туполистный и Щ. водный. Отмечено, что они обладают сходным с официальным щавелем конским метаболомом, что в свою очередь подтверждает потенциал изучения данных видов. Научный и практический интерес представляет изучение динамики накопления ведущей группы биологически активных веществ – антраценпроизводных в зависимости от фенологических faz развития растения.

**Цель.** Выделение, идентификация и количественное определение антраценпроизводных в подземных органах Щ. конского, Щ. курчавого, Щ. туполистного и Щ. водного, заготовленных в три различные вегетации.

**Материалы и методы.** В качестве анализируемых растворов использовались извлечения из подземных органов изучаемых растений полученные по методике из фармакопейной статьи на щавель конский. Растворы анализировали на хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором и автосamplerом по индивидуально подобранныму градиенту элюирования подвижной фазы (0,1%-й раствор ортофосфорной кислоты/ацитонитрила). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония). Соединения из группы антраценпроизводных идентифицировали по временам удерживания. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора с динамическим изменением длины волны поглощения в ходе анализа от 365 ± 2 нм до 254 ± 2 нм.

**Результаты и обсуждение.** Были получены спирто-водные извлечения из подземных органов Щавелей. Подобран градиент элюирования для одновременного определения 5-ти антраценпроизводных со временем единичного анализа 40 минут. Данные хроматографические условия позволили идентифицировать и определить количественное содержание эмодина, 8-O-β-D-глюкозида эмодина и хризофановой кислоты в подземных органах Щ. конского, Щ. водного, Щ. курчавого и Щ. туполистного трёх различных вегетаций. Гликозиды антраценпроизводных: глюкофрангулин А и франгулин А в изучаемых объектах обнаружены не были.

**Заключение.** Из подземных органов Щ. конского, Щ. водного, Щ. курчавого и Щ. туполистного были выделены антраценпроизводные, разработана методика количественного определения антраценпроизводных в спирто-водных извлечениях, обнаружены и количественно определены эмодин, 8-O-β-D-глюкозид эмодина и хризофановая кислота.

**Ключевые слова:** антраценпроизводные, эмодин, ВЭЖХ-УФ, корни, *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*

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

**Вклад авторов.** А. М. Полуянов и Н. В. Бобкова придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов и А. Ю. Соколова провели исследования методом ВЭЖХ-УФ. А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова, Е. А. Малашенко и Е. В. Сергунова участвовали в обработке данных. А. М. Полуянов, Е. А. Малашенко и Н. В. Бобкова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Для цитирования:** Полуянов А. М., Соколова А. Ю., Малашенко Е. А., Сергинова Е. В., Бобкова Н. В. Выделение, идентификация и количественное определение антраценпроизводных методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):216–225. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-216-225>

## Isolation, Identification and Quantitative Determination of Anthracene Derivatives by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus *Rumex* of Three Vegetation Times

Andrey M. Poluyanov<sup>1,2</sup>✉, Anna Yu. Sokolova<sup>2</sup>, Evgeniya A. Malashenko<sup>1,2</sup>,  
Ekaterina V. Sergunova<sup>2</sup>, Natalia V. Bobkova<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

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

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University, 27/1, Lomonosovskiy ave., Moscow, 119991, Russia

✉ Corresponding author: Andrey M. Poluyanov. E-mail: a.poluyanov@cpha.ru

ORCID: Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>; Anna Yu. Sokolova – <https://orcid.org/0000-0002-7500-5880>;

Evgeniya A. Malashenko – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>; Ekaterina V. Sergunova – <https://orcid.org/0000-0002-7194-5525>;

Natalia V. Bobkova – <https://orcid.org/0000-0003-1591-4019>.

Received: 06.10.2022

Revised: 00.11.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** The creation of new highly effective drugs requires a thorough study of the metabolome of plant raw materials and a comparative phytochemical study of the underground organs of closely related species of Rumex, such as: *R. crispus*, *R. obtusifolius* and *R. aquaticus*, ubiquitous in Russia. It was noted that they have a metabolome like the official *R. confertus*, which in turn confirms the potential for studying these species. Of scientific and practical interest is the study of the dynamics of accumulation of the leading group of biologically active substances – anthracene derivatives, depending on the phenological phases of plant development.

**Aim.** Identify and quantify anthracene derivatives in the underground organs of *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius* and *R. aquaticus* harvested in three different phases of vegetation.

**Materials and methods.** Extracts from the underground organs of the studied plants obtained according to the method from the pharmacopoeial article on *R. confertus* were used as the analyzed solutions. The solutions were analyzed on a Nexera-i LC-2040 chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a column and sample thermostat, a degasser, and an autosampler using an individually selected mobile phase elution gradient (0.1 % phosphoric acid/acetonitrile solution). Primary data were processed using LabSolutions Single LC software (Shimadzu Corporation, Japan). Compounds from the group of anthracene derivatives were identified by retention times. Detection was carried out using a UV detector with a dynamic change in the absorption wavelength during analysis from  $365 \pm 2$  nm to  $254 \pm 2$  nm.

**Results and discussion.** Alcohol-water extracts were obtained from the underground organs of *Rumex*. An elution gradient was selected for the simultaneous determination of 5 anthracene derivatives with a single analysis time of 40 minutes. These chromatographic conditions made it possible to identify and quantify the content of emodin, 8-O- $\beta$ -D-glucoside of emodin, and chrysophanol in the underground organs of *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius* and *R. aquaticus* in three different vegetations. Glycosides of anthracene derivatives: glucofrangulin A and frangulin A were not found in the studied objects.

**Conclusion.** Anthracene derivatives were isolated from the underground organs of different vegetations, a method for the quantitative determination of anthracene derivatives in alcohol-water extracts was developed, emodin, 8-O- $\beta$ -D-glucoside of emodin and chrysophanol were found and quantified.

**Keywords:** anthracene derivatives, emodin, HPLC-UV, roots, *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*

**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.** Andrey M. Poluyanov and Natalia V. Bobkova invented and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov and Anna Yu. Sokolova analyze on HPLC-UV. Andrey M. Poluyanov, Anna Yu. Sokolova, Evgeniya A. Malashenko and Ekaterina V. Sergunova participated in data processing. Andrey M. Poluyanov, Evgeniya A. Malashenko and Natalia V. Bobkova participated in writing the text of the article. All authors participated in discussion of the results

**For citation:** Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Malashenko E. A., Sergunova E. V., Bobkova N. V. Isolation, identification and quantitative determination of anthracene derivatives by HPLC-UV method in the raw materials of some representatives of the genus *Rumex* of three vegetation times. *Drug development & registration*. 2022;11(4):216–225. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-216-225>

## ВВЕДЕНИЕ

Основная задача современной фармакогнозии – поиск новых источников биологически активных веществ (БАВ) с целью расширения сырьевой базы, что в свою очередь позволит создать высокоэффективные лекарственные препараты отечественного производства.

Повсеместно распространенные в нашей стране представители рода Щавель (*Rumex*) обладают набором различных групп БАВ: антраценпроизводные (АП), дубильные вещества, фитоалексины, флавониды, органические кислоты, сапонины, аминокислоты и полисахариды [1, 2], что потенциально обуславливает широкий спектр фармакологического действия [3].

В настоящее время в Российской Федерации разрешен к медицинскому применению лишь один пред-

ставитель рода Щавель: Щавель (далее Щ.) конский (*Rumex confertus* Willd.), достаточно хорошо изучен его химический состав [4]. В фармакопейной статье для Щ. конского в сырье – подземных органах указана методика для количественного определения суммы АП в пересчете на 8-O- $\beta$ -D-глюкозид эмодина методом спектрофотометрии (СФМ).

Особый интерес представляет сравнительное фитохимическое изучение подземных органов близкородственных видов Щавелей, таких как: Щ. курчавый, Щ. туполистный и Щ. водный. Отмечено, что они обладают сходным метаболомом, что в свою очередь подтверждает потенциал изучения данных видов [5, 6].

В литературных источниках сообщается о наличии в метаболоме изучаемых щавелей таких веществ гликозидной структуры из группы АП, как: хризофенол-1-O- $\beta$ -D-глюкозид, 8-O- $\beta$ -D-глюкозид эмодина,

франгулин А, глюкофрангулин А [7, 8]. Агликонами для этих веществ являются хризофановая кислота и эмодин. В статьях преимущественно преобладает количественный анализ БАВ в цветках, плодах и листьях. Информация о определении количественного содержания антраценпроизводных современными инструментальными методами в подземных органах рассматриваемых видов отсутствует, за исключением статьи [9], где указано общее содержание АП в метанольных экстрактах из подземных органов у Щ. конского 163,2 мг/г, Щ. курчавого 25,22 мг/г и Щ. туполистного 14,71 мг/г, где в качестве метода для оценки количественного содержания использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ). Данный метод также часто используется в анализе других морфологических групп [10, 11].

Научный и практический интерес представляет изучение динамики накопления биологически активных веществ в зависимости от фенологических faz развития растения. Согласно нормативной документации для подземных органов лекарственных растений (ОФС.1.5.1.0006.15 «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы») лекарственное растительное сырье заготавливают в fazу увядания надземной части. Количественное содержание агликонов АП зависит от жизненного цикла растения и fazы вегетации [12].

Целью данного исследования является выделение, идентификация и количественное определение АП в подземных органах Щ. конского, Щ. курчавого, Щ. туполистного, Щ. водного, заготовленных в различные fazы вегетации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реагенты: ацетонитрил (класс «for UHPLC», PanReac, Испания); муравьиная кислота (класс «for analysis», PanReac, Испания); этанол 95%-й (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия); вода деминерализованная (класс чистоты I). Для приготовления растворов стандартных образцов были использованы следующие субстанции: эмодин, субстанция порошок, содержание эмодина 98%-го (HPLC, Sigma-Aldrich, США, серия 043K35051, годен до 06.2028); хризофановая кислота, субстанция порошок, содержание хризофановой кислоты 98,3%-й (Supelco Inc., США, серия BCCG0998, годен до 05.2024); 8-O-β-D-глюкозид эмодина, субстанция порошок, содержание глюкозида эмодина 92,04%-го (PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия, серия 120413929, годен до 09.2026); глюкофрангулин А, субстанция порошок, содержание глюкофрангулина А 98,72%-го (PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия, серия 111810966, годен до 08.2024); франгулин А, субстанция порошок, содержание франгулина А 98,87 %-го (PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия, серия 114031178, годен до 12.2024).

Исходные стандартный растворы готовили путем растворения точной навески субстанции в этаноле 95%-м класса «х.ч.». Рабочие стандартные растворы были приготовлены путем разведения аликовты исходного стандартного раствора тем же растворителем.

### Оборудование

Определение влажности измельченных подземных органов проводили на приборе анализаторе влагосодержания OHAUS MB27 (OHAUS, США). Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

### Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическая колонка: Grace HPLC Column Platinum C8-EPS, 250 × 4.6 mm, 5mm (Grace, США).

Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges Widelore C18, 4 × 3,0 мм.

Температура термостата: 27 °C.

Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему) (элюент А); 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему) (элюент В).

Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.

Градиент состава подвижной фазы представлен на рисунке 1.

Объем вводимой пробы: 10 мкл.

Время удерживания 8-O-β-D-глюкозида эмодина: около 16,6 мин.

Время удерживания эмодина: около 28,5 мин.

Время удерживания хризофановой кислоты: около 29,5 мин.

Время регистрации хроматограммы: 0,0–40,0 мин.

Детектирование: УФ-детектор с динамическим изменением длины волны поглощения в ходе анализа от 365 ± 2 нм до 254 ± 2 нм, представлено на рисунке 1.

### Объекты исследования

Для данного исследования были собраны подземные органы следующих видов: Щ. конский – *Rumex confertus* Willd., Щ. водный – *Rumex aquaticus* L., Щ. курчавый – *Rumex crispus* L., щавель туполистный – *Rumex obtusifolius* L., заготовленные в период весеннего отрастания (апрель–май 2022 года) – «отрастание», в период цветения (июнь–июль 2021 года) – «цветение», в период увядания надземной части (октябрь 2021 года) – «увядание». В таблице 1 представлены исследуемые объекты, а также место и дата их заготовки.

Собранные подземные органы были промыты от земли проточной холодной водой. Перед сушкой наиболее массивные подземные органы были разде-

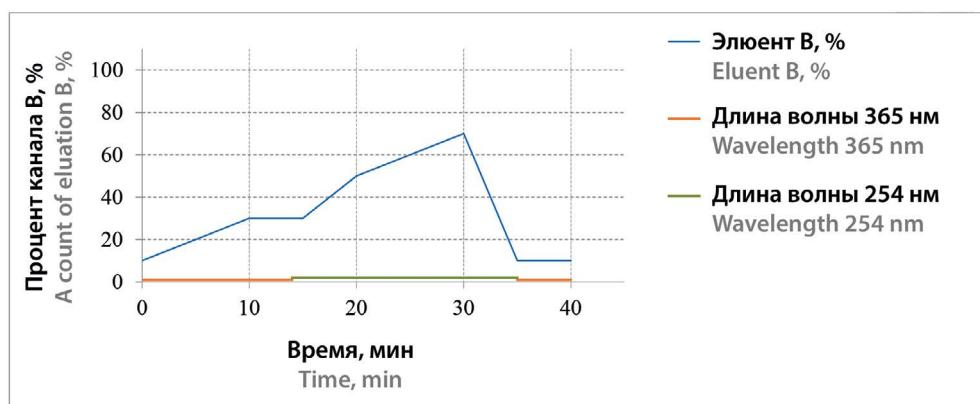


Рисунок 1. Градиент состава подвижной фазы

Figure 1. Elution's gradient

Таблица 1. Исследуемые объекты

Table 1. Investigated objects

Объект анализа Object	Место произрастания Location of growth	Фаза вегетации, срок заготовки Vegetation phase, harvesting period	
Щ. конский <i>Rumex confertus</i> Willd.	Поселение Роговское, Москва, Россия Координаты: 55.245626, 37.009576 Rogovskoye, Moscow, Russia Coordinates: 55.245626, 37.009576	отрастание, апрель 2022 Regrowth, April 2022	
		цветение, июнь 2021 flowering, June 2021	
		увядание, октябрь 2021 dieback, October 2021	
Щ. курчавый <i>Rumex crispus</i> L.	Поселение Краснопахорское Москва, Россия Координаты: 55.384859, 37.225441 Krasnopakhorskoye settlement Moscow, Russia Coordinates: 55.384859, 37.225441	отрастание, апрель 2022 regrowth, April 2022	
		цветение, июнь 2021 flowering, June 2021	
		увядание, октябрь 2021 dieback, October 2021	
Щ. туполистный <i>Rumex obtusifolius</i> L.	Поселение Роговское, Москва, Россия Координаты: 55.245626, 37.009576 Rogovskoye settlement, Moscow, Russia Coordinates: 55.245626, 37.009576	отрастание, апрель 2022 regrowth, April 2022	
		цветение, июнь 2021 flowering, June 2021	
		увядание, октябрь 2021 dieback, October 2021	
Щ. водный <i>Rumex aquaticus</i> L.	Поселение Роговское, Москва, Россия Координаты: 55.245626, 37.009576 Rogovskoye settlement, Moscow, Russia Coordinates: 55.245626, 37.009576	отрастание, апрель 2022 regrowth, April 2022	
		цветение, июль 2021 flowering, July 2021	
		увядание, октябрь 2021 dieback, October 2021	

лены вдоль на две части. Сушка производилась при комнатной температуре в хорошо- проветриваемом помещении, без доступа солнечных лучей. Влажность высшенного сырья была определена с помощью влагомера и не превышала 13 %.

### Пробоподготовка

Из сырья были получены спиртовые извлечения по методике количественного определения из фармакопейной статьи для сырья Щавеля конского корни (ФС.2.5.0052.15).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики

Для идентификации и определения количественного содержания БАВ был выбран метод ВЭЖХ-УФ. Данный метод является более селективным и чувствительным, чем СФМ, а также позволяет обнаружить и количественно определить соединения рассматриваемой группы БАВ.

Условия хроматографического разделения были подобраны экспериментально, опираясь на статьи об

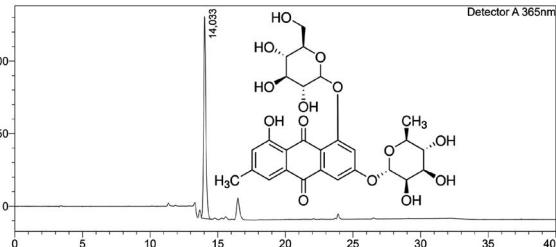
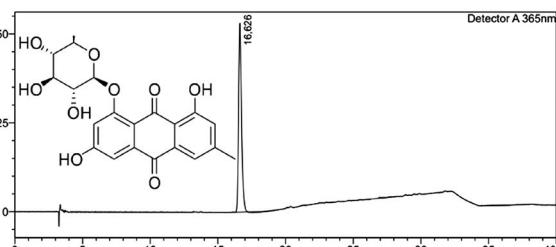
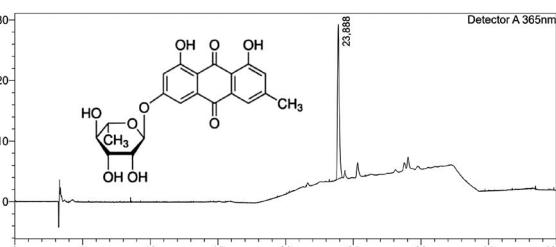
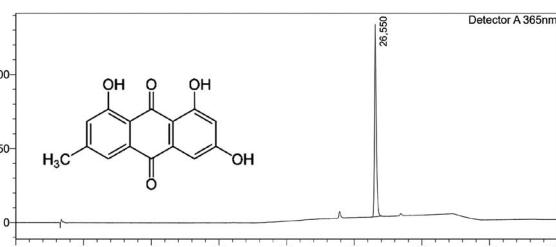
анализе в растительном сырье эмодина [13], хризофановой кислоты [14], франгулина А и глюкофрангулина А [15], затем доработаны под изучаемые объекты, из-за ряда особенностей: плохое разделение компонентов различной природы (гликозиды и агликоны) в рамках одной методики, близкие значения липофильности большинства АП ( $\log P$  от 3,5 до 2) и присутствие множества других компонентов, содержащихся в растительном сырье, которые влияли на аналиты и искали форму пиков. Анализ франгулина А и глюкофрангулина методом ВЭЖХ-УФ в изучаемых объектах проводился впервые.

Для детектирования исследуемых веществ использовался ультрафиолетовый детектор, который регистрировал вещества за счет наличия хромофорных групп в их строении (таблица 2).

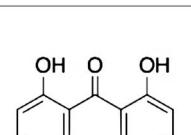
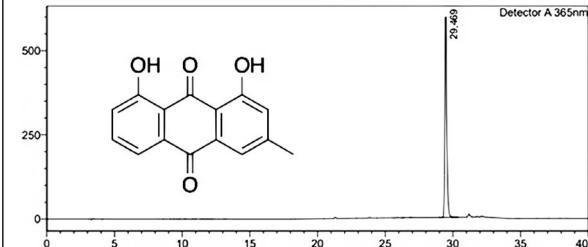
Присутствие 8-O- $\beta$ -D-глюкозида эмодина, хризофановой кислоты и эмодина во всех проанализированных пробах было подтверждено. По окончании анализа проводилось измерение площадей пиков двух агликонов: эмодина и хризофановой кислоты, а также одного гликозида: 8-O- $\beta$ -D-глюкозида эмодина в растворах соответствующих стандартных образцов и в извлечениях из изучаемых объектов.

**Таблица 2. Физико-химические свойства анализируемых веществ**

**Table 2. Physical and chemical properties of the analyzed substances**

Соединение Compound	$\log P$	$\log S$	Время удерживания, мин Retention time, min	Структурная формула Structural formula
Глюкофрангулин А Glucofrangulin A	-0,4	-2,2	14,03	
8-O- $\beta$ -D-глюкозид эмодина 8-O- $\beta$ -D-emodin glucoside	0,9	-2,3	16,63	
Франгулин А Frangulin A	1,4	-2,4	23,86	
Эмодин Emodin	2,7	-3,09	26,55	

Окончание таблицы 2

Соединение Compound	$\log P$	$\log S$	Время удерживания, мин Retention time, min	Структурная формула Structural formula
Хризофановая кислота Chrysophanic acid	3.1	-3.31	29,47	 

В проанализированных объектах отсутствовал пик вещества с соответствующим стандартному образцу временем удерживания для франгулина А и глюкофрангулина, что позволяет утверждать, что данные

вещества в испытуемых объектах не обнаружены. На рисунке 2 приведены хроматограммы извлечений из подземных органов изучаемых объектов различных вегетаций.

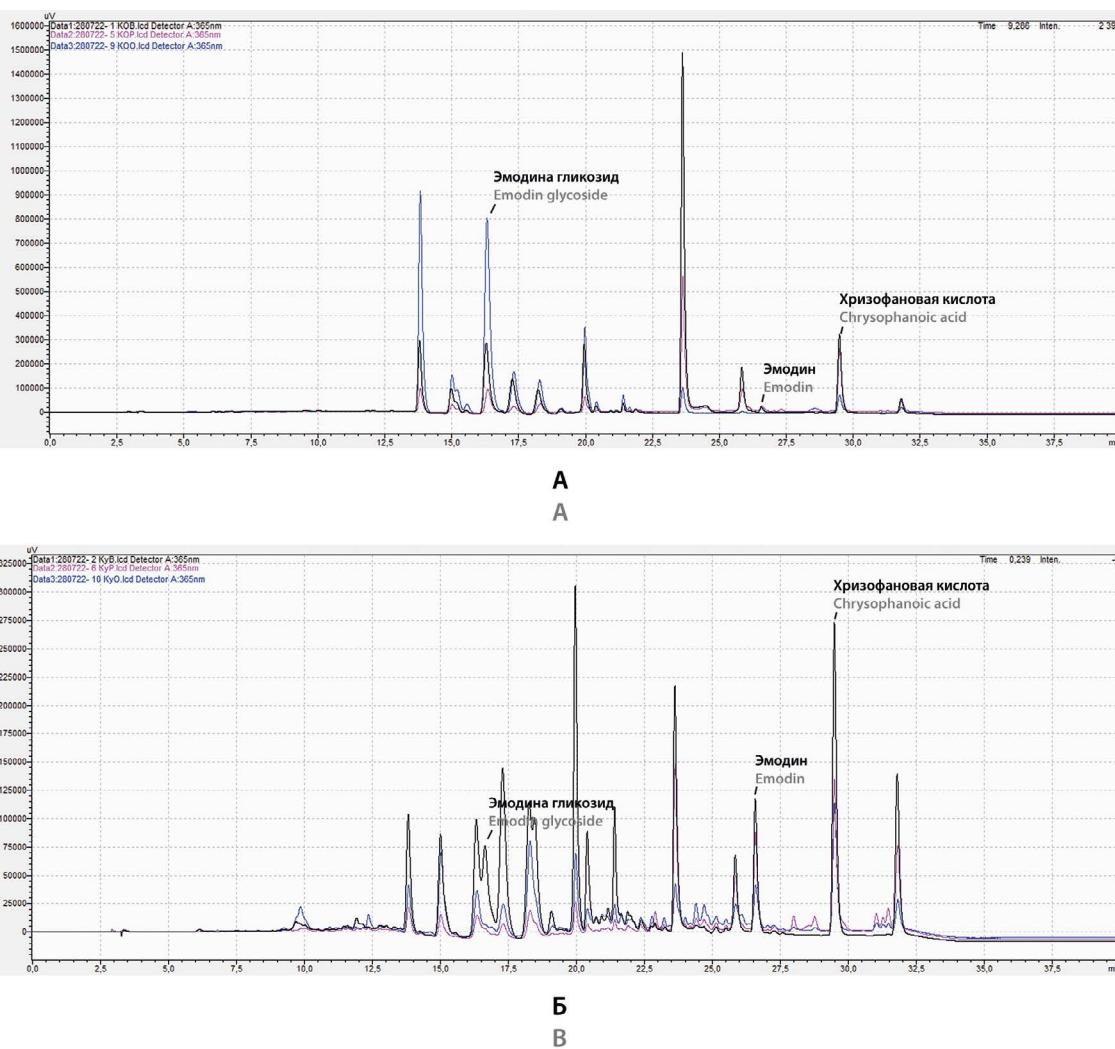
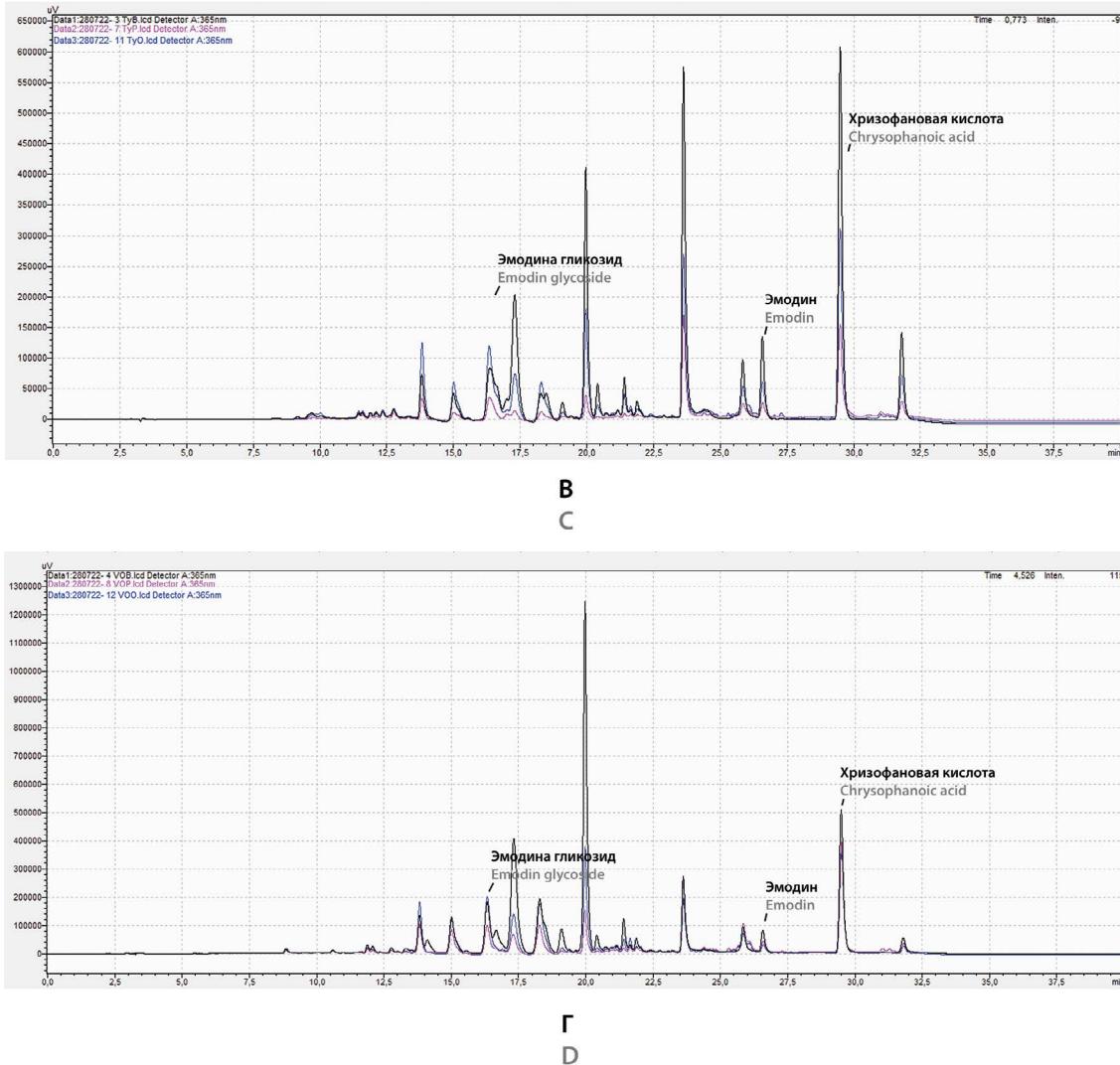


Рисунок 2. Хроматограммы спирто-водных извлечений.

Черная линия – фаза цветения; розовая – фаза отмирания; синяя – фаза отрастания

Figure 2. Chromatograms of alcohol-water extracts.

The black line is the flowering phase; the pink line is the end of the growing season; the blue line is the beginning of the growing season



**Продолжение рисунка 2**

**Continuation of Figure 2**

Для разработанной методики была проведена проверка пригодности хроматографической системы и определены значения параметров пригодности (таблица 3).

Результаты статистической обработки проведенных измерений показывают, что относительная ошибка единичного определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает  $\pm 3,48\%$  (таблица 4).

Для всех изучаемых объектов рассчитаны значения количественного содержания эмодина, хризофановой кислоты и 8-O- $\beta$ -D-глюкозида эмодина в пересчёте на абсолютно сухое сырье, в % и представленные в таблице 5.

Лидирующим пиком в области хроматограммы, соответствующей времени удерживания агликонов АП зачастую был пик хризофановой кислоты. Наибольшее содержание хризофановой кислоты отмечено у щ. туполистного в период цветения. Также стоит отметить наибольшее содержание хризофановой кислоты в период цветения у всех 4 видов.

**Таблица 3. Параметры пригодности хроматографической системы**

**Table 3. Chromatographic system suitability parameters.**

Соединение Compound	Время удерживания, мин Retention time, min	Разрешение Resolution	Количество теоретических гарелок Number theoretical plates	Коэффициент симметрии Symmetry factor
8-O- $\beta$ -D-глюкозид эмодина 8-O- $\beta$ -D-glucoside emodin	16,62	–	33609	1,29
Эмодин Emodin	26,59	34,49	199106	1,06
Хризофановая кислота Chrysophanic acid	29,50	11,93	224100	1,14

**Таблица 4. Метрологические характеристики методики количественного определения 8-О-β-D-глюкозид эмодина, эмодина и хризофановой кислоты в спирто-водных извлечениях во время цветения ( $n = 5, f = 4, P = 95 \%, T(f, P) = 2,7764$ )**

**Table 4. Metrological characteristics of the procedure for the quantitative determination of 8-O-β-D-glucoside of emodin, emodin and chrysophanol in alcohol-water extracts during flowering ( $n = 5, f = 4, P = 95 \%, T(f, P) = 2,7764$ )**

Вид Species	Соединение Compound	$\bar{X}, \%$	$S_x^2$	$S_x$	$S_{\bar{x}}$	$\Delta X$	$E, \%$
Щ. конский <i>R. confertus</i>	8-о-β-D-глюкозид эмодина 8-O-β-D-glucoside emodin	1,327	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,22 \times 10^{-2}$	$5,45 \times 10^{-3}$	$1,51 \times 10^{-3}$	1,14
	Эмодин Emodin	0,029	$6,44 \times 10^{-7}$	$8,02 \times 10^{-4}$	$3,59 \times 10^{-4}$	$9,96 \times 10^{-4}$	3,48
	Хризофановая кислота Chrysophanolic acid	0,321	$2,34 \times 10^{-5}$	$4,83 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-3}$	$6,00 \times 10^{-3}$	1,87
Щ. курчавый <i>R. crispus</i>	8-о-β-D-глюкозид эмодина 8-O-β-D-glucoside emodin	0,451	$1,73 \times 10^{-6}$	$1,32 \times 10^{-3}$	$5,88 \times 10^{-4}$	$1,63 \times 10^{-3}$	0,36
	Эмодин Emodin	0,161	$1,22 \times 10^{-5}$	$3,50 \times 10^{-3}$	$1,56 \times 10^{-3}$	$4,34 \times 10^{-3}$	2,69
	Хризофановая кислота Chrysophanolic acid	0,281	$2,40 \times 10^{-6}$	$1,55 \times 10^{-3}$	$6,93 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^{-3}$	0,69
Щ. туполистный <i>R. obtusifolius</i>	8-о-β-D-глюкозид эмодина 8-O-β-D-glucoside emodin	0,187	$1,02 \times 10^{-5}$	$3,20 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-3}$	$3,97 \times 10^{-3}$	2,13
	Эмодин Emodin	0,180	$1,04 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$4,56 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-3}$	0,71
	Хризофановая кислота Chrysophanolic acid	0,622	$4,88 \times 10^{-5}$	$6,99 \times 10^{-3}$	$3,12 \times 10^{-3}$	$8,67 \times 10^{-3}$	1,40
Щ. водный <i>R. aquaticus</i>	8-о-β-D-глюкозид эмодина 8-O-β-D-glucoside emodin	0,792	$3,56 \times 10^{-5}$	$5,97 \times 10^{-3}$	$2,67 \times 10^{-3}$	$7,41 \times 10^{-3}$	0,94
	Эмодин Emodin	0,102	$1,44 \times 10^{-6}$	$1,20 \times 10^{-3}$	$5,37 \times 10^{-4}$	$1,49 \times 10^{-3}$	1,47
	Хризофановая кислота Chrysophanolic acid	0,531	$8,24 \times 10^{-6}$	$2,87 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^{-3}$	$3,56 \times 10^{-3}$	0,67

**Примечание.**  $\bar{X}, \%$  – среднее значение;  $S_x^2$  – дисперсия;  $S_x$  – стандартное отклонение;  $S_{\bar{x}}$  – стандартное отклонение среднего результата;  $\Delta X$  – доверительный интервал;  $E, \%$  – относительная ошибка определения.

**Note.**  $\bar{X}, \%$  – mean value;  $S_x^2$  – variance;  $S_x$  – standard deviation;  $S_{\bar{x}}$  – standard deviation of the mean result;  $\Delta X$  – confidence interval;  $E, \%$  – relative error of determination.

Наибольшее содержание эмодина отмечено у Щ. туполистного во время цветения, наименьшее у Щ. конского в период отрастания.

8-О-β-D-глюкозид эмодина был обнаружен во всех объектах, его количественное содержание в % приведено на рисунке 3. Из диаграммы видно отсутствие корреляции фаза вегетации – содержание 8-О-β-D-глюкозида эмодина между разными видами.

Для каждой вегетации было подсчитано суммарное содержание обнаруженных АП в каждом виде (таблица 6).

Как видно из таблицы, наибольшее содержание суммы АП установлено у Щ. конского в фазе весеннего отрастания, наименьшее – у Щ. курчавого конца вегетации. Интересно отличие Щ. курчавого от других изучаемых объектов: у него наблюдается большее содержание веществ в период цветения. У всех остальных видов присутствует тенденция снижения содержания АП от фазы отрастания к фазе увядания.

Эта информация дает основание полагать, что помимо щавеля конского большую перспективу представляет изучение щавеля водного *Rumex aquaticus* L., щавеля курчавого – *Rumex crispus* L., щавеля туполистного – *Rumex obtusifolius* L., исходя из полученных данных

о содержании хризофановой кислоты, эмодина и его гликозида. Отмечено значительно большее содержание каждого вещества в период цветения для большинства растений. Полученные данные противоречат принятым нормам заготовки сырья, так как официальное сырье корни Щавеля конского заготавливаются осенью или весной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках исследования Щ. конского – *Rumex confertus* L., Щ. водного – *Rumex aquaticus* L., Щ. курчавого – *Rumex crispus* L., Щ. туполистного – *Rumex obtusifolius* L. трех различных сроков вегетации была апробирована методика выделения антраценпроизводных по ФС для Щ. конского, разработана методика количественного определения АП в спирто-водных извлечениях позволяющая объективно и достоверно определять присутствие доминирующей группы БАВ – антраценпроизводные. Были обнаружены и количественно определены эмодин, 8-О-β-D-глюкозид эмодина и хризофановая кислота во всех изучаемых объектах, проанализирована динамика их накопления в зависимости от фазы вегетации.

**Таблица 5. Количество содержание эмодина, хризофановой кислоты и 8-О-β-D-глюкозид эмодина**

**Table 5. The quantitative content of emodin, chrysophanoic acid and emodin 8-O-β-D-glucoside**

<b>Фаза вегетации</b> <b>Vegetation phase</b>	<b>Содержание эмодина, в %</b> <b>The content of emodin, in %</b>			
	<b>Щ. конский</b> <i>R. confertus</i>	<b>Щ. курчавый</b> <i>R. crispus</i>	<b>Щ. туполистный</b> <i>R. obtusifolius</i>	<b>Щ. водный</b> <i>R. aquaticus</i>
Весеннее отрастание Spring regrowth	0,002 ± 0,001 %	0,054 ± 0,002 %	0,080 ± 0,002 %	0,040 ± 0,001 %
Цветение Flowering	0,029 ± 0,001 %	0,161 ± 0,004 %	0,180 ± 0,001 %	0,102 ± 0,001 %
Отмирание надземной части Overhead part dieback	0,028 ± 0,001 %	0,119 ± 0,001 %	0,033 ± 0,001 %	0,043 ± 0,001 %
<b>Содержание хризофановой кислоты, в %</b> <b>The content of chrysophanic acid, in %</b>				
Весеннее отрастание Spring regrowth	0,097 ± 0,002	0,119 ± 0,003	0,334 ± 0,002	0,403 ± 0,010
Цветение Flowering	0,321 ± 0,005	0,281 ± 0,002	0,622 ± 0,007	0,531 ± 0,003
Отмирание надземной части Overhead part dieback	0,162 ± 0,001	0,087 ± 0,001	0,100 ± 0,001	0,236 ± 0,001
<b>Содержание 8-О-β-D-глюкозида эмодина, в %</b> <b>The content of 8-O-β-D-glucoside emodin, in %</b>				
Весеннее отрастание Spring regrowth	3,732 ± 0,022	0,169 ± 0,001	0,670 ± 0,016	0,907 ± 0,003
Цветение Flowering	1,327 ± 0,010	0,451 ± 0,001	0,187 ± 0,003	0,792 ± 0,006
Отмирание надземной части Overhead part dieback	0,453 ± 0,002	0,063 ± 0,001	0,239 ± 0,003	0,498 ± 0,002

**Примечание.** Значение процентного содержания указано, как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Approx.

**Note.** The percentage value is indicated as the arithmetic mean ± standard deviation.

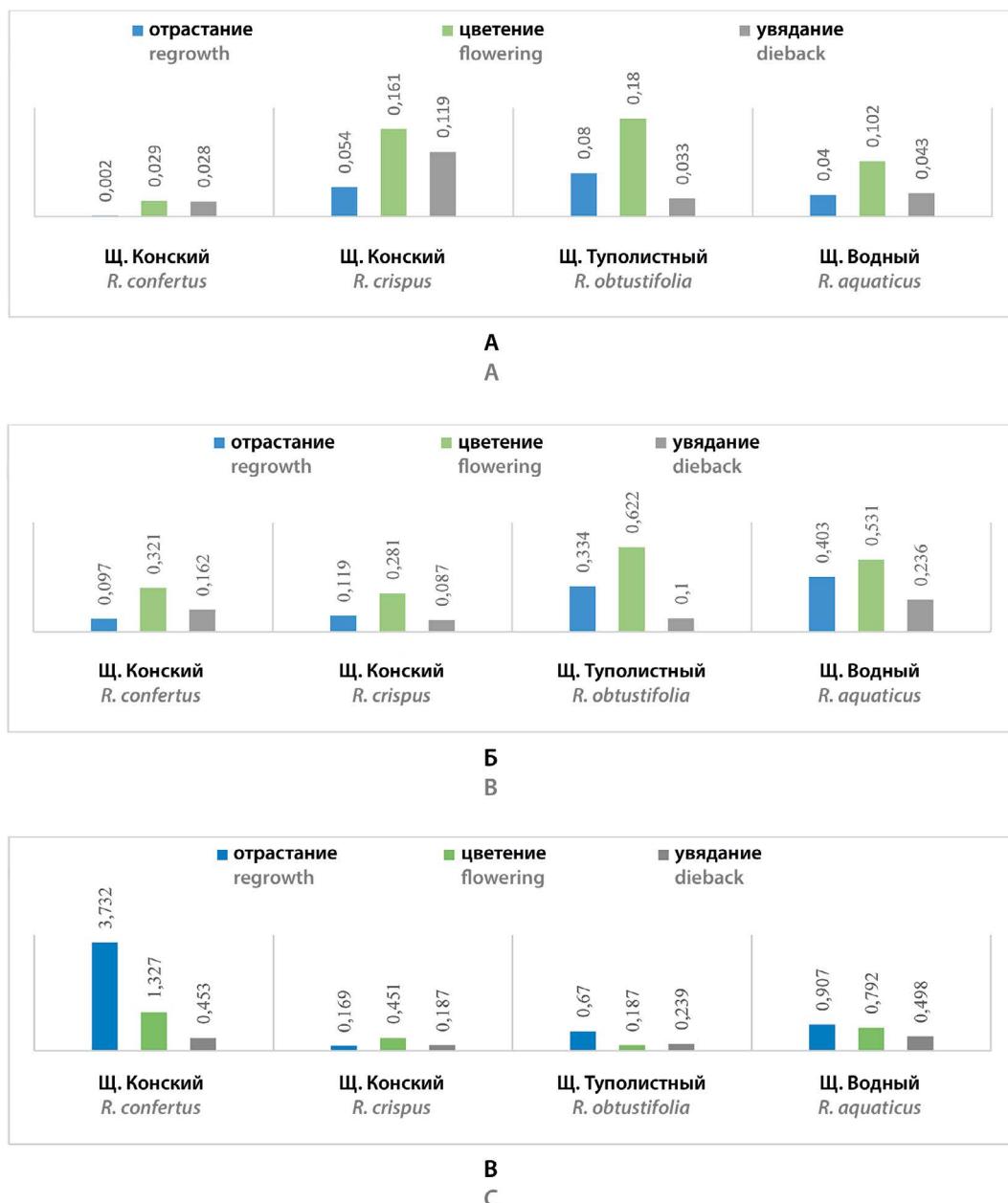
**Таблица 6. Содержание суммы определенных АП, в %**

**Table 6. The content of the amount of certain AP, in %**

<b>Фаза вегетации</b> <b>Vegetation phase</b>	<b>Щ. конский, %</b> <i>R. confertus, %</i>	<b>Щ. курчавый, %</b> <i>R. crispus, %</i>	<b>Щ. туполистный, %</b> <i>R. obtusifolius, %</i>	<b>Щ. водный, %</b> <i>R. aquaticus, %</i>
Весеннее отрастание Spring regrowth	3,901	0,342	1,084	1,350
Цветение Flowering	1,677	0,893	0,989	1,425
Отмирание надземной части Overhead part dieback	0,643	0,269	0,372	0,777

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Prakash Mishra A., Sharifi-Rad M., Shariati M. A., Mabkhout Y. N., Al-Showiman S. S., Rauf A., Salehi B., Župunski M., Sharifi-Rad M., Gusain P., Sharifi-Rad J., Suleria H. A. R., Iriti M. Bioactive compounds and health benefits of edible Rumex species-A review. *Cellular and Molecular Biology*. 2018;64(8):27–34. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.8.5.
- Salama S. A., AL-Faifi Z. E., Masood M. F., El-Amier Y. A. Investigation and Biological Assessment of Rumex vesicarius L. Extract: Characterization of the Chemical Components and Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Anti-Dengue Vector Activity. *Molecules*. 2022;27(10):3177. DOI: 10.3390/molecules27103177.
- Wang Q., Yang J. B., Wang Y., Li Y. Y., Wen H. R., Zhang Y. J., Ma S. C. Toxicokinetics of emodin-8-O-β-D-glucoside in rats in vivo. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2022;47(15):4214–4220. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220516.701.
- Berillo D., Kozhahmetova M., Lebedeva L. Overview of the Biological Activity of Anthraquinones and Flavanoids of the Plant Rumex Species. *Molecules*. 2022;27(4):1204. DOI: 10.3390/molecules27041204.
- Li J.-J., Li Y.-X., Li N., Zhu H.-T., Wang D., Zhang Y.-J. The genus Rumex (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Nat. Prod. Bioprospect.* 2022;12(1):21. DOI: 10.1007/s13659-022-00346-z.
- Feduraev P., Chupakhina G., Maslennikov P., Tacenko N., Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from Rumex crispus L. and Rumex obtusifolius L. at Different Growth Stages. *Antioxidants*. 2019;8(7):237. DOI: 10.3390/antiox8070237.
- Demirezer Ö. L. Concentrations of Anthraquinone Glycosides of Rumex crispus during Different Vegetation Stages. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1994;C(49):404–406. DOI: 10.1515/znc-1994-7-802.
- Smolarz H. D., Wegiera M., Wianowska D., Dawidowicz A. L. Anthracene derivatives in some species of Rumex L. genus. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2011;76(2):103–108. DOI: 10.5586/asbp.2007.013.
- Degano, Ilaria, Tognotti P., Kunzelman D., Modugno F. HPLC-DAD and HPLC-ESI-Q-ToF characterisation of early 20th century lake and organic pigments from Lefranc archives. *Heritage Science*. 2017;5(1):7. DOI: 10.1186/s40494-017-0120-y.



**Рисунок 3. Диаграмма количественного содержания АП.**

А – эмодин; Б – хризофановая кислота; В – 8-О-β-D-глюкозид эмодина

**Figure 3. Diagram of the quantitative content of AP.**

A – emodin; B – chrysophanoic acid; C – emodin 8-O-β-D-glucoside

10. Feduraev P., Skrypnik L., Nebreeva S., Dzhobadze G., Vatagina A., Kalinina E., Pungin A., Maslennikov P., Riabova A., Krol O., Chupakhina G. Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some Rumex Species (Polygonaceae). *Antioxidants*. 2022;11(2):311. DOI: 10.3390/antiox11020311.
11. Lin C., Chen M., Cai J., Lai J., Zheng Y., Yang X. Determination of Emodin, Chrysophanol, and Physcion by HPLC in the Chinese Medicine *Rumex japonicus* Houtt. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2012;31(6):909–913.
12. Jan S., Kamili A. N., Parray J. A., Bedi Y. S. Differential response of terpenes and anthraquinones derivatives in *Rumex dentatus* and *Lavandula officinalis* to harsh winters across north-western. *Natural Product Research*. 2016;30(5):608–612. DOI: 10.1080/14786419.2015.1030404.
13. Husein, Ahmad I., Ali-Shtayeh S. M., Waheed J. J., Zatar N. A., Al-Nurie M. A. High Performance Liquid Chromatographic Method for Quantitative Determination of Emodin in Rumex Cyprinus Marb, Spectrophotometric Studies. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*. 2014;217–222.
14. Demirezer Ö. L. Rapid and Simple Biological Activity of Some Rumex Species; Evaluation of Bioguided Fractions of *R. scutatus* and Pure Compounds. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 1997;C52(9):461–462. DOI: 10.1515/znc-1997-9-1014.
15. Rosenthal I., Wolfram E., Peter S., Meier B. Validated method for the analysis of frangulins A and B and glucofrangulins A and B using HPLC and UHPLC. *Journal of Natural Products*. 2014;77(3):489–496. DOI: 10.1021/np400736s.



## Разработка и валидация определения элтромбопага в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС

А. М. Аль-Дураиби<sup>1,2✉</sup>, А. Л. Куликов<sup>2</sup>, М. В. Покровский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии и клинической фармакологии, Аденский университет, Аден, Йемен

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ). Научно-исследовательский институт фармакологии живых систем, лаборатория фармакокинетических исследований. 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85, корпус 11

✉ Контактное лицо: Аль-Дураиби Абдулла Мохаммед. E-mail: aldhuraibi2019@gmail.com

ORCID: А. М. Аль-Дураиби – <https://orcid.org/0000-0002-9044-243X>; А. Л. Куликов – <https://orcid.org/0000-0001-6422-0377>; М. В. Покровский – <https://orcid.org/0000-0002-1493-3376>.

Статья поступила: 18.01.2022

Статья принята в печать: 15.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** «Элтромбопаг» – агонист рецепторов тромбопоэтина (TPO-RAs), одобренный для лечения иммунной тромбоцитопенической пурпурой (ИТП). В соответствии с изученной литературой, было обнаружено, что существует очень мало аналитических методов для определения элтромбопага в биологических образцах. Для изучения фармакокинетики новых составов элтромбопага необходим чувствительный и специфичный метод, позволяющий точно определять концентрации элтромбопага в плазме крови человека. Обычно методы ВЭЖХ должны обеспечивать время, точность и чувствительность. Поэтому необходимо разработать быстрые или сверхбыстрые методы, такие как LC-MS/MS, без какой-либо потери эффективности и чувствительности разделения.

**Цель.** Наша цель заключалась в разработке и валидации метода, нацеленное на количественное определение элтромбопага в человеческой плазме крови при том, чтобы использовались методы высокоточной жидкостной хроматографии с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) для выполнения аналитической части фармакокинетических исследований.

**Материалы и методы.** Количество элтромбопага в плазме человека определяли с помощью ВЭЖХ-МС. Способ осаждения белков был проведен в качестве пробоподготовки.

**Результаты и обсуждение.** Разработанную методику валидировали по линейности, переносу пробы, стабильности, селективности, точности, эффекту матрицы, прецизионности, пределу количественного определения препарата.

**Заключение.** Метод определения элтромбопага в плазме крови человека был разработан и валидирован методом ВЭЖХ-МС. При исследовании аналитического диапазона препарат элтромбопаг в плазме составил 10–6750 нг/мл. Данный аналитический диапазон разработанной методики может быть применен для проведения аналитической части фармакокинетических исследований препаратов, содержащих в составе элтромбопаг.

**Ключевые слова:** «Элтромбопаг», плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, биоэквивалентность

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

**Вклад авторов.** А. М. Аль-Дураиби, А. Л. Куликов участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики и проводили статистическую обработку данных. М. В. Покровский отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

**Для цитирования:** Аль-Дураиби А.М., Куликов А.Л., Покровский М.В. Разработка и валидация определения элтромбопага в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4):226–239. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-226-239>

## Development and Validation of Eltrombopag Determination in Human Plasma Blood by HPLC-MS Method

Abdullah M. AL-Dhuraibi<sup>1,2✉</sup>, Alexandr L. Kulikov<sup>2</sup>, Mikhail V. Pokrovskiy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Aden University, Aden, Yemen

<sup>2</sup> Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University». Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Laboratory of Pharmacokinetic Research. 85/11, Pobeda str., Belgorod, 308015, Russia

✉ Corresponding author: Abdullah. M. Al-Dhuraibi. E-mail: aldhuraibi2019@gmail.com

ORCID: Abdullah M. AL-Dhuraibi – <https://orcid.org/0000-0002-9044-243X>; Alexandr L. Kulikov – <https://orcid.org/0000-0001-6422-0377>; Mikhail V. Pokrovskiy – <https://orcid.org/0000-0002-1493-3376>.

Received: 18.01.2022      Revised: 15.09.2022      Published: 25.11.2022

### Abstract

**Introduction.** "Eltrombopag" is a thrombopoietin receptor agonist (TPO-RA) that is approved for the treatment of immune thrombocytopenic purpura (ITP). According to the literature, very few analytical methods for determining eltrombopag in biological samples have been reported. To study the pharmacokinetics of new formulations of eltrombopag, a sensitive and specific method is required that allows one to accurately determine the concentration of eltrombopag in human blood plasma. Normally, HPLC methods should provide time, accuracy, and sensitivity as a result, it is necessary to develop fast or ultra-fast methods such as LC-MS/MS without any loss in sensitivity or separation efficiency.

**Aim.** We aimed to develop and validate a method for the quantitative determination of eltrombopag levels in human plasma by using HPLC with mass spectrometric detection for performing the analytical part of pharmacokinetic studies.

**Materials and methods.** Eltrombopag levels were determined in human plasma by HPLC with mass spectrometric detection. The samples were prepared using protein deposition.

**Results and discussion.** The method was validated for selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, the limit of quantification, carry-over effect, and sample stability.

**Conclusion.** The method for the determination of eltrombopag levels in human plasma has been developed and validated by HPLC-MS. The analytical range of eltrombopag levels in human plasma was 10–6750 ng/ml. This method could be used to determine eltrombopag levels in plasma for PK and BE studies.

**Keywords:** "Eltrombopag", plasma, HPLC-MS/MS, validation, bioequivalence

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

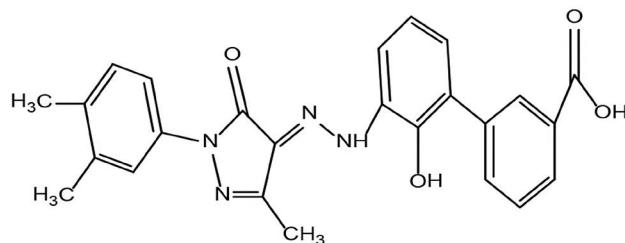
**Contribution of the authors.** Abdullah M. AL-Dhuraibi, Alexandr L. Kulikov have developed and validated an analytical method and carried out statistical processing of the obtained results. Mikhail V. Pokrovskiy carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

**For citation:** AL-Dhuraibi A. M., Kulikov A. L., Pokrovskiy M. V. Development and validation of eltrombopag determination in human plasma blood by HPLC-MS method. *Drug development & registration*. 2022;11(4):226–239. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-226-239>

## ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпуря (ИТП) представляет собой заболевание, при котором иммунная система атакует тромбоциты и вызывает снижение их количества, подвергая пациента риску кровотечения. Диагноз ставится методом исключения [1]. Элтромбопаг является пероральным биодоступным агонистом рецептора тромбопоэтина (ТПО-Р), одобренным для лечения иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ИТП). Текущие показания к применению элтромбопага включают лечение гепатита С и тяжелой апластической анемии [2–4] (рисунок 1). Обычная начальная доза составляет 25 мг в день, а поддерживающая доза составляет 75 мг в день [1].

Препарат имеет высокое сродство к связыванию с белками плазмы и преимущественно выводится путем метаболизма в печени и желудочно-кишечном тракте [5]. Согласно литературным данным, существует очень мало аналитических методов для определения элтромбопага в биологических образцах, включая жидкостную хроматографию, методов масс-спектрометрии [6, 7] и методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [8]. Например, был разработан простой метод ВЭЖХ для определения концентрации элтромбопага в сыворотке с использованием обычной колонки с октадецилсилил силикагелем (ODS), изократной элюзией и УФ-детектированием [4]. Оламин в фармацевтической лекарственной форме с использованием ОФ-ВЭЖХ, метода сверхэфф-



**Рисунок 1. Структурная формула «Элтромбопаг»**

**Figure 1. Chemical structure of "Eltrombopag"**

ективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-УЭЖХ) или нового гибкого, совместимого по массе изократического метода, показывающего стабильность, разработанного с использованием сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) для оценки элтромбопага вместе с его примесями в составе таблеток [9–11]. Количественное определение элтромбопага в плазме человека остается сложной задачей из-за его физико-химических свойств и полярности. Для изучения фармакокинетики новых лекарственных форм элтромбопага необходим чувствительный и специфический метод для точного определения концентрации элтромбопага в плазме крови человека. Как правило, методы ВЭЖХ требуют затрат времени, возникают погрешности в разрешении или чувствительности. Следовательно,

**Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения элтромбопага**

**Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of Eltrombopag levels**

Аналитический метод Analytical method	Пробоподготовка Sample preparation	Объект анализа Object	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml	Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	Плазма крови человека Human blood plasma	10–2500	[12]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	Плазма крови человека Human blood plasma	50–10007	[8]

необходимо разработать быстрые или сверхбыстрые методы, такие как ЖХ-МС/МС, без потери эффективности и чувствительности разделения. Таким образом, целью данного исследования была разработка простого, быстрого и чувствительного метода ЖХ-МС/МС для определения элтромбопага в плазме крови человека (таблицы 1, 2).

**Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне**

**Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level**

Уровень Level	Концентрация аналита «Элтромбопаг», нг/мл Analyte concentration "Eltrombopag", ng/ml	Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/m
1	10	748
2	30	748
3	337	748
4	1012	748
5	1350	748
6	1687	748
7	5061	748
8	6748	748
LLOQ	10	748
L	30	748
M	4049	748
H	6750	748

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Оборудование

- Центрифуга лабораторная, многоканальная Centrifuge 5430R (Eppendorf, Германия, аттестована до 25.02.2020).
- Лабораторный встряхиватель ThermoMixer C (Eppendorf, Германия).
- Весы электронные РА 213С (OHAUS Corporation, США, свидетельство о поверке действует до 25.02.2021).
- Жидкостный хроматограф UltiMate 3000 RS LC (Thermo Fisher Scientific, США) с масс-селективным детектором Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, США, свидетельство о поверке действует до 06.02.2020).
- Колонка хроматографическая 2,1 × 150 мм, ZORBAX Eclipse Plus, 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. № 959757-902).
- Ультразвуковая баня с мощностью излучателя 3 Вт.

### Реактивы и растворы

- Аммиак (25 %) (PanReac, Испания, каталожный № 141129).
- Уксусная (ледяная) кислота для ВЭЖХ (PanReac, Испания, каталожный № 361008.1611).
- Ацетонитрил (Gradient Grade, Merck KGaA, Германия, каталожный номер 100030.2500).
- Метанол (hypergrade for LC-MS LiChrosolv®, Merck Millipore, США, каталожный № 106035).

### 1. Стандартные образцы

- Стандартный образец элтромбопагаmonoэтаноламина Э10619 (годен до 06.21).
- Активная фармацевтическая субстанция, пошедшая на приготовление растворов контроля качества, партия 010719.
- Внутренний стандарт USP RS lot G0K135 (valid in use day) глимиепирид: 1-[[4-[2-(3-этил-4-метил-2-оксо-3-пирролин-1-карбоксамидо)-этил]фенил]сульфонил]-3-транс-(4-метилциклогексил)мочевина, брутто-формула: C24H34N4O5S и молекулярная масса: 490,6 г/моль CAS: 93479-97-1.

### 2. Биологическая матрица

- Плазма крови от 6 индивидуальных источников.

### Условия проведения и приготовление растворов

#### Приготовление растворов

Во время отбора проб и последующего измерения параметров все имеющиеся растворы были 18–20 °C (в соответствии с ГФ XIII, XIV изд). Измерение определений каждого из параметров проводилось при постоянных условиях. Все растворы приготовлены в соответствии с биоаналитической методикой (таблицы 3, 4). Используемые реактивы для приготовления:

*Раствор внутреннего стандарта m = 12,63 мг.*

- Исходный раствор 1 для приготовления градиуровочной растворов: навеска элтромбопага monoэтаноламиан (точная навеска) m = 14,40 мг (в пересчете на элтромбопаг m = 12,65 мг).
- Растворы для стандартов качества (К) m = 14,40 мг (в пересчете на элтромбопаг m = 12,65 мг). Используемое оборудование представлено в разделе 2.4. Процедуры по подготовке и хроматографические условия соответствовали биоаналитической методике (таблицы 3, 4).

**Таблица 3. Аликвота исходных растворов, добавляемая в к**

**Table 3. An aliquot of stock solutions was added to C**

№ исходного раствора №. of original solution	№ k № C							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Аликвота исходного раствора 3, мл Aliquot of stock solution 3, ml	0,015	0,045	–	–	–	–	–	–
Аликвота исходного раствора 2, мл Aliquot of stock solution 2, ml	–	–	0,01	0,03	0,04	0,05	0,15	0,2
<sup>1</sup> C <sub>элтр</sub> в р-ре, нг/мл <sup>1</sup> C <sub>eltr</sub> in solution, ng/ml	3	9	101	303	405	506	1518	2024
<sup>2</sup> C <sub>элтр</sub> в пересчете на 1 мл плазмы, нг/мл <sup>2</sup> C <sub>eltr</sub> in terms of 1 ml of plasma, ng/ml	10	30	337	1012	1350	1687	5061	6750

**Примечание.** <sup>1</sup> Количество ЭЛТР в финальном растворе.

<sup>2</sup> Количество ЭЛТР в пересчете на 1 мл плазмы крови.

**Note.** <sup>1</sup> Quantity of ELTR in the final solution.

<sup>2</sup> The amount of ELTR in terms of 1 ml of blood plasma.

**Таблица 4. Аликвота исходных растворов, добавляемая в КК**

**Table 4. An aliquot of stock solutions was added to QC**

№ исходного раствора №. of original solution	№ KK QC			
	ПКО LLOQ	НKK L	СKK M	ВК H
Аликвота исходного раствора 3, мл Aliquot of stock solution 3, ml	0,015	0,045	–	–
Аликвота исходного раствора 2, мл Aliquot of stock solution 2, ml	–	–	0,12	0,2
<sup>1</sup> Сэлтр, в р-ре, нг/мл <sup>1</sup> C eltr, in solution, ng/ml	3	9	1215	2024
<sup>2</sup> Сэлтр, в пересчете на 1 мл плазмы, нг/мл <sup>2</sup> Celtr, in terms of 1 ml of plasma, ng/ml	10	30	4049	6750

**Примечание.** <sup>1</sup> Количество ЭЛТР в финальном растворе.

<sup>2</sup> Количество ЭЛТР в пересчете на 1 мл плазме крови.

**Note.** <sup>1</sup> Quantity of ELTR in the final solution.

<sup>2</sup> The amount of ELTR in terms of 1 ml of blood plasma.

## Условия хроматографического разделения и детектирования

Подготовка оборудования. В начале работы был включен жидкостной хроматограф, затем осуществлена выдержка 30 минут для того, чтобы параметры работы стабилизировались. Далее была подключена стальная хроматографическая колонка размером 2,1 × 50 мм, которая была заполнена обращено-фазовым сорбентом октадецилсиликагель с размером частиц 1,8 мкм (например, ZORBAX Eclipse Plus, 2,1 × 50 мм, 1,8 мкм кат. № 959757-902). Далее установлена температура термостата колонок 30 ± 5 °C, а также задана насосной системе скорость потока 0,4 мл/мин. При этом режим разделения градиентный, состоящий из двух этапов (основное элюирование и промывка) по следующей схеме (таблица 5).

**Таблица 5. Градиентное элюирование**

**Table 5. Gradient elution**

Время, мин Time, min	Скорость потока ПФ, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min	0,03%-я уксусная кислота, % об 0,03 % acetic acid, % vol	Ацетонитрил, % об Acetonitrile, % vol	Наименование этапа Stage name
0	0,4	40	60	Основное элюирование Main elution
3,0	0,4	25	75	
3,1	0,6	10	90	
4,5	0,6	10	90	Промывка, уравновешивание Flushing, equilibration
4,6	0,4	40	60	
5,5	0,4	40	60	

Было указано 5,0 мкл автоматической системе ввода образца. Время хроматографирования одного цикла – 5,5 мин.

Ориентировочные времена удерживания:

- внутренний стандарт – около 1,0 мин;
- элтромболаг – около 2,8 мин.

Все работы с масс-селективным детектором проводились в строгом соответствии с инструкцией по эксплуатации и СОП. Затем был выключен режим «Stand by», выдерживая 15 минут для стабилизации базовой линии, и установлены следующие параметры, показанные в таблице 6.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики

Настоящая работа посвящена исследованию валидационных характеристик разработанной биоаналитической методики количественного определения концентрации элтромболага в биологической матрице (плазмы крови человека).

**Таблица 6. Параметры**

**Table 6. Parameters**

Тип ионизации Ionization type	ESI, SRM «+», режим ионизации CID для элтромбопага ESI, SRM «+», режим ионизации CID для внутреннего стандарта ESI, SRM «+», CID ionization mode for eltrombopag ESI, SRM «+», CID ionization mode for internal standard
Переход масс Mass transition	ЭЛТР 443,22 → 322,7; IS 491,60 → 452,1 Eltrombopag 443.22 → 322.7; IS 491.60 → 452.1
Температура источника Source temperature	380 °C
Температура капилляра Capillary temperature	400 °C
Напряжение на источнике Source voltage	3000 В (ЭЛТР), 3000 В (IS) 3000 V (Eltr), 3000 V (IS)
Энергия соударения (CE) Impact energy	ЭЛТР – 30 IS – 35 Eltr – 30 IS – 35
Газ соударений Collision gas	Гелий Helium
Поток Sheath газа Flow Sheath газа	60
Поток Aux газа Aux gas flow	20
Поток Sweep газа Sweep gas flow	1
Остальные параметры в соответствии с автоматической оптимизацией прибора. Other parameters according to the automatic optimization of the device.	

В современной практике клинических исследований существует огромное количество биоаналитических методик для определения. В основе 95 % публично опубликованных методик лежит метод высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с различной детекцией. В исследованиях высокого уровня, связанных с клиническими испытаниями, как правило, используется tandemное масс-спектрометрические детектирование (MC/MC). Это является «золотым стандартом» для получения достоверных, надежных и точных результатов. ВЭЖХ-МС/МС, как метод очень зависит от ряда факторов. Например таких, как используемый тип ионизации, условия и температурные режимы, состав и качество подвижных, стационарных фаз и других ключевых характеристик. Сложность всех основных процессов, а особенно процессов МС/МС детекции настолько высока, что приемлемая воспроизводимость условий на приборах одинаковых типов, но разных производителей крайне затруднена. Это обусловлено разностью реализации фундаментального физико – химического закона, лежащего в основе определения.

В связи с этим, необходимость разработки биоаналитических методик, применительно к конкрет-

ному комплексу оборудования, конкретной матрице, конкретному диапазону определений является актуальной задачей. Если рассматривать такие задачи через призму регуляторных норм, становится очевидным, что валидация это неотъемлемая часть любой разработки.

Таким образом, целью работы являлось подтверждение на основании лабораторных исследований надежности метода для определения концентрации элтромбопага в биологической матрице для получения достоверного результата, а предметом валидации – биоаналитическая методика определения концентрации элтромбопага в биологической матрице.

### **Валидация методики**

Валидация методики исследования, направленного на препарат Элтромбопаг проводилась соответственно нормам GLP, рекомендациям руководства по экспертизе лекарственных средств (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (2013 г.) [13], Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, FDA 05.2018<sup>1</sup>. Guideline on validation of bioanalytical methods. European Medicines Agency Committee for medicinal products for human use<sup>2</sup>. Валидация методики включает показатели:

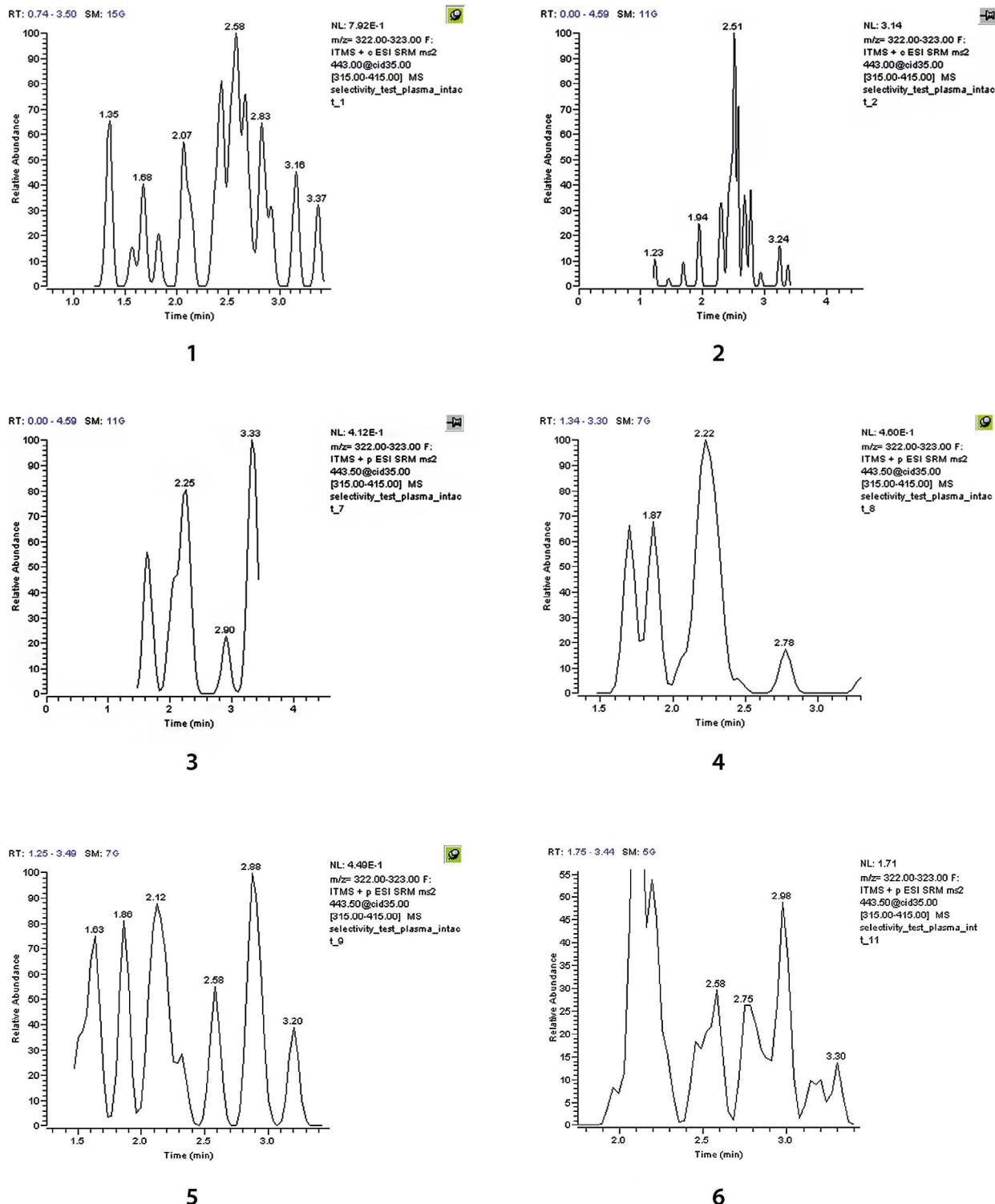
- селективности;
- эффекта матрицы;
- линейности / калибровочной кривой;
- правильности (на уровнях inter-day и intra-day);
- точность и прецизионность (на уровнях inter-day и intra-day);
- нижнего предела количественного определения;
- кросс-переноса (carryover);
- стабильности основного раствора элтромбопага и внутреннего стандарта,
- стабильности препарата элтромбопаг в плазме в условиях обработки и в течение всего периода хранения (постпрепартивная стабильность; кратковременная температурная стабильность; стабильность после замораживания/оттаивания; долговременная температурная стабильность);
- степени извлечения.

### **Селективность**

Селективность биоаналитической методики была изучена на 6 образцах холостой матрицы от 6 индивидуальных источников. Для этого готовили и анализировали испытуемые растворы холостой мат-

<sup>1</sup> Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 25.02.2021.

<sup>2</sup> Bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 25.02.2021.



**Рисунок 2.1.** Нулевая плазма крови от шести разных источников (1-6) в диапазоне сканирования элтромбопага

**Figure 2.1.** Zero blood plasma from six different sources (1-6) in the scan range of Eltrombopag

рицы в соответствии с биоаналитической методикой. Результаты представлены на рисунках 2 и 3. Полученные результаты показывают, что интерференции не наблюдается ни в одном из источников ни на одном из исследуемых пиков, методика обладает при-

емлемой селективностью. Селективность методики считается удовлетворительной при условии, что показатели не больше 20 % от нижней концентрации определяемых веществ и не больше 5 % от содержания внутреннего стандарта.

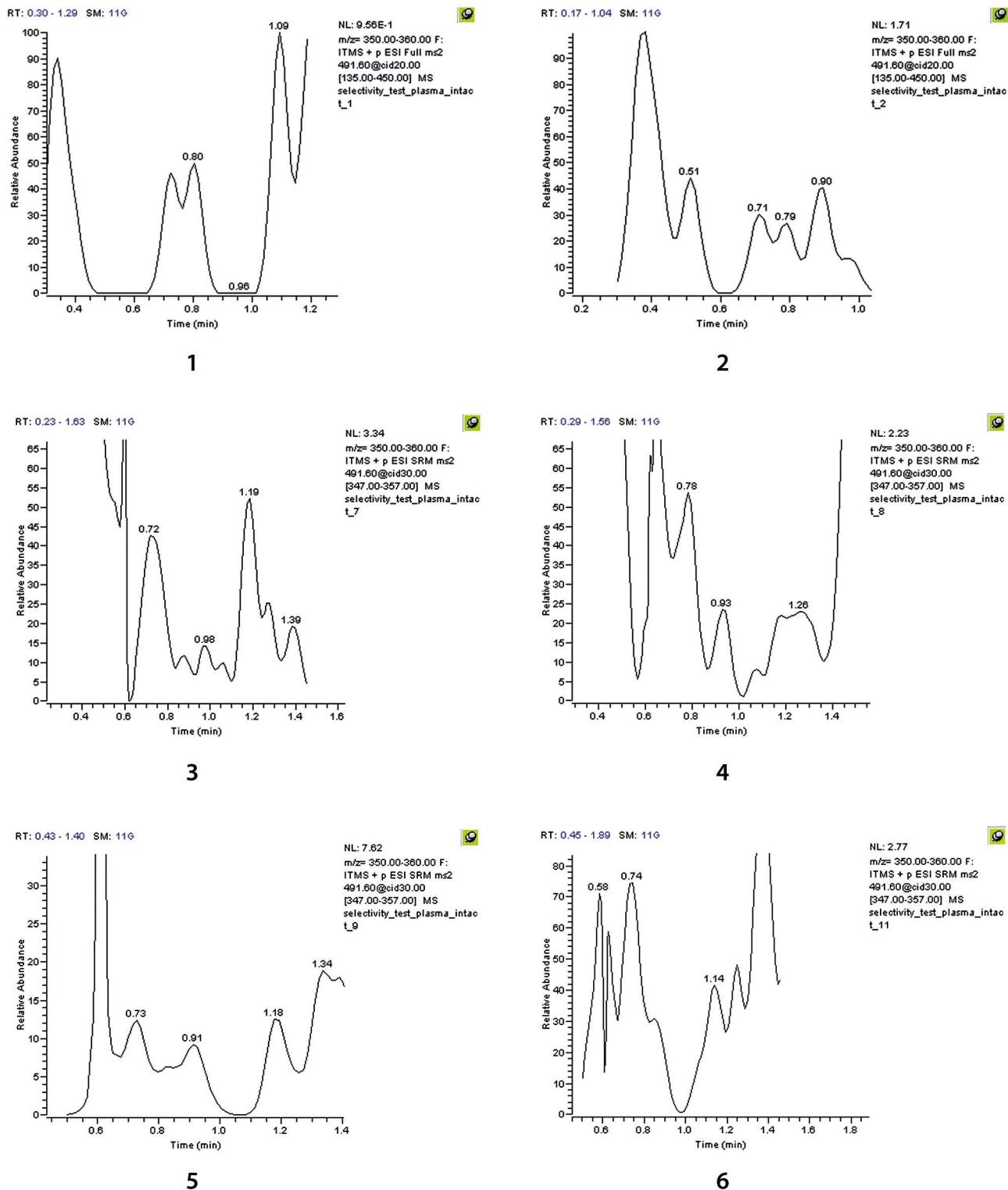


Рисунок 3. Нулевая плазма крови от шести разных источников (1–6) в диапазоне сканирования внутреннего стандарта

Figure 3. Zero blood plasma from six different sources (1–6) in the scan range of the internal standard

### Эффект матрицы

Изучено влияние матрицы на получаемые результаты в условиях биоаналитической методики. Для этого готовили и анализировали растворы холостой матрицы, к ним добавляли аналит на уровне ННК и

ВКК в соответствии с биоаналитической методикой (в таблицах 3–4). Кроме этого, готовили растворы, в которых холостая матрица была заменена на воду (для расчета абсолютного матричного фактора). Результаты выполненной работы представлены в табли-

цах 7–8. Для нормализованного матричного фактора CV не превышает 15 %. Для абсолютного матричного фактора не наблюдается ни подавления, ни усиления сигнала. Влияние матрицы стабильное.

**Таблица 7. Расчет нормализованного матричного фактора**

**Table 7. Calculation of the normalized matrix factor**

Раствор Solution	$S_{i_0}$	$S_{i_0}$	Нормализованная площадь ЭЛТР без матрицы Normalized ELTR area without matrix	$S_i$	$S_{is}$	Нормализованная площадь ЭЛТР с матрицей Normalized ELTR area with matrix	MF	CV, %
HKK LQC	51	652	0	49	654	0	1	4
	49	654	0	51	656	0	1	
	47	612	0	48	658	0	1	
	48	627	0	47	653	0	1	
	50	668	0	46	651	0	1	
	49	647	0	44	621	0	1	
BKK HQC	9366	662	141	8990	661	136	1	4
	9288	639	145	8755	639	137	1	
	8999	622	145	8749	635	138	1	
	9211	637	145	8762	697	126	1	
	9087	644	141	8788	655	134	1	
	9120	672	136	9122	644	142	1	

**Таблица 8. Расчет абсолютного матричного фактора**

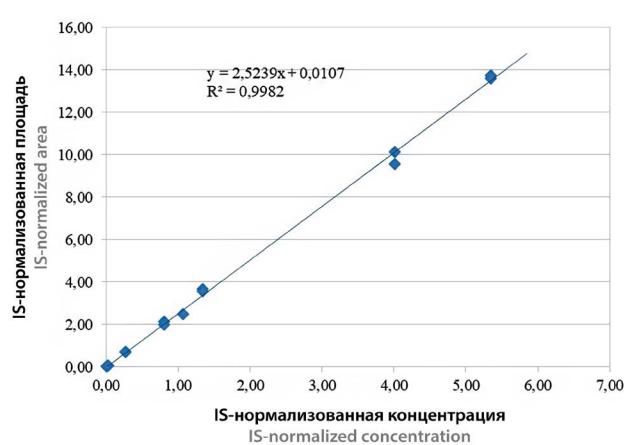
**Table 8. Calculation of the absolute matrix factor**

Наименование раствора Solution name	$S$	Отношение средних $S$ Average S ratio	CV, %	Наименование раствора Solution name	$S$	Отношение средних $S$ Average S ratio	CV, %	Наименование раствора Solution name	$S$	Отношение средних $S$ Average S ratio	CV, %
HKK без добавление матрицы LQC without matrix addition	51	1,03	4,25	BKK без добавление матрицы HQC without matrix addition	9366	1,04	2,41	Внутренний стандарт без добавление мат- рицы Internal standard wi- thout matrix addition	662	0,986	3,10
	49				9288				639		
	47				8999				622		
	48				9211				637		
	50				9087				644		
	49				9120				672		
Среднее Average	49			Среднее Average	9179			Среднее Average	646		
CV, %	2,9			CV, %	1,5			CV, %	2,8		
HKK с добавлением матрицы LQC with matrix ad- dition	49			8990	661						
	51			8755	639						
	48			8749	635						
	47			8762	697						
	46			8788	655						
	44			9122	644						
Среднее Average	48			Среднее Average	8861			Среднее Average	655		
CV, %	5,1			CV, %	1,8			CV, %	3,5		

**Таблица 9. Расчет линейности методики определения элтромбопага**

**Table 9. Calculation of the linearity of the method for determining Eltrombopag**

$C_{\text{введ.}}, \text{нг/мл}$ Injected concentration, ng/ml	$S_{\text{ЭЛТР}}$ $S_{\text{ELTR}}$	$S_{\text{IS}}$	$S_{\text{ЭЛТР}}/S_{\text{IS}}$ $S_{\text{ELTR}}/S_{\text{IS}}$	$C_{\text{ЭЛТР}}/C_{\text{IS}}$ $C_{\text{ELTR}}/C_{\text{IS}}$	$C_{\text{найд.}}, \text{нг/мл}$ $C_{\text{found}}, \text{ng/ml}$	Ошибка, % $E, \%$	Критерий приемлемости Acceptance criterion
10	20	675	0	0	9	-7	Не более 20 % No more than 20 %
10	19	635	0	0	10	-5	Не более 20 % No more than 20 %
30	46	694	0	0	28	-8	Не более 15 % No more than 15 %
30	47	682	0	0	29	-4	Не более 15 % No more than 15 %
337	452	625	1	0	357	6	Не более 15 % No more than 15 %
337	445	620	1	0	354	5	Не более 15 % No more than 15 %
1012	1256	590	2	1	1060	5	Не более 15 % No more than 15 %
1012	1198	598	2	1	997	-1	Не более 15 % No more than 15 %
1350	1455	589	2	1	1231	-9	Не более 15 % No more than 15 %
1350	1488	593	3	1	1250	-7	Не более 15 % No more than 15 %
1687	2156	584	4	1	1842	9	Не более 15 % No more than 15 %
1687	2355	660	4	1	1780	6	Не более 15 % No more than 15 %
5061	6388	667	10	4	4787	-5	Не более 15 % No more than 15 %
5061	6847	676	10	4	5063	0	Не более 15 % No more than 15 %
6750	9201	677	14	5	6796	1	Не более 15 % No more than 15 %
6750	9301	676	14	5	6880	2	Не более 15 % No more than 15 %



**Рисунок 4. Графическое отображение линейного диапазона зависимости площади пика элтромбопага (нормализованной на внутренний стандарт) от концентрации(нормализованной на внутренний стандарт)**

**Figure 4. Graphical display of the linear range of the peak area of Eltrombopag (normalized to internal standard) versus concentration (normalized to internal standard)**

## Правильность

### Правильность внутри цикла

Была изучена правильность биоаналитической методики внутри одного аналитического цикла. Для этого готовили и анализировали растворы к и КК в соответствии с биоаналитической методикой (в таблицах 3–4). Обрабатывали полученные результаты. При оценке результатов были использованы критерии приемлемости. Результаты представлены в таблице 2. В результате ошибки найденной концентрации относительно введенной не превышает для минимальной концентрации (НПКО) 20 %, для всех остальных уровней не более 15 %. Правильность методики внутри цикла удовлетворительная (таблица 10).

### Правильность и прецизионность

В таблице 2 представлен проведенный анализ калибровочных образцов плазмы крови, которые соответствуют уровням LLOQ, L, M и H. Анализ ва-

**Таблица 10.** Правильность определения элтромбопага в плазме крови человека (внутри цикла, день 1)

**Table 10. Accuracy of determination of Eltrombopag in human blood plasma (within the cycle, day 1)**

Раствор Solution	$C_{\text{введ.}}$ , нг/мл $C_{\text{Injected}}$ , ng/ml	$C_{\text{ЭЛТР}}/C_{is}$ $C_{\text{ELTR}}/C_{is}$	$S_{\text{ЭЛТР}}$ $S_{\text{ELTR}}$	$S_{is}$	$f$	$C_{\text{найд.}}$ , нг/мл $C_{\text{found}}$ , ng/ml	$C_{\text{найд. ср.}}$ , нг/мл $C_{\text{found, sr}}$ , ng/ml	$s^2$	$S$	$P$	$t$	$\Delta_x$ , нг $\Delta_x$ , ng	$CV$ , %	$e_r$ , %	Правильность, % Accuracy, %
НПК			19	646		9								-8	92
O			21	667		10								3	103
LLOQ	10	0	20	656	4	10	10	0	1	1	3	2	7	-2	98
			19	661		9								-11	89
			21	655		11								5	106
HKK			49	646		33								7	107
L			44	651		28								-6	94
	30	0	46	655	4	30	31	5	2	1	3	7	8	-2	98
			45	663		29								-6	94
			50	644		33								10	110
СКК			4988	656		3800								-6	94
M			4931	652		3779								-7	93
	4049	3	5188	657	4	3946	3977	51000	230	1	3	630	6	-3	98
			5325	662		4020								-1	99
			5764	664		4339								7	107
BKK			9130	646		7067								5	105
H			8788	650		6760								0	100
	6748	5	9143	654	4	6991	6990	26000	160	1	3	450	2	4	104
			9041	652		6934								3	103
			9244	642		7200								7	107
$e_r$ , % $e_{r\text{справ.}}$ , %														0	
$s$														6	
$\Delta e_r$ , %														3	

лидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Правильность и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). В результате CV между средними результатами найденной концентрации элтромбопага, рассчитанное по 4 аналитическим циклам, выполненным в 4 разных дня по 4 разным градуировочным кривым, не превышает для

минимальной концентрации (НПКО) 20 %, для всех остальных уровней не более 15 %. Прецизионность методики между циклами удовлетворительная (таблица 11).

#### Нижний предел количественного определения (НПКО)

По данным о линейности, точности и прецизионности был определен нижний предел количественного определения методов. Методы НПКО – мини-

**Таблица 11.** Расчет прецизионности определения элтромбопага между циклами по растворам контроля качества

**Table 11. Calculation of the precision of the determination of Eltrombopag between cycles of quality control solutions**

Раствор Уровень Level	$C_{\text{найд. ср.}}$ , нг/мл $C_{\text{found, sr}}$ , ng/ml	$CV$ , %	Критерий приемлемости Acceptance criterion			
	День 1 Day 1	День 2 Day 2	День 3 Day 3	День 4 Day 4		
LLOQ	10	10	10	10	3	Не более 20 % No more than 20 %
L	31	30	31	31	1	Не более 15 % No more than 15 %
M	3977	3941	4019	4020	1	Не более 15 % No more than 15 %
H	6990	6718	6608	7115	3	Не более 15 % No more than 15 %

мальная концентрация элтромбопага в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого можно количественно определить элтромбопаг со значениями RSD и E менее 20 %. Нижний предел обнаружения метода составил 10,12 нг/мл. Отношение сигнал/шум составляло 19 при концентрации 10,12 нг/мл (в пересчете на 1 мл плазмы крови человека). Раствор (НПКО) – менее строгий стандарт калибровки. Предел обнаружения элтромбопага составляет около 3,3 нг в 1 мл плазмы крови при использовании этого метода. Результат представлен на рисунке 5.

### Стабильность

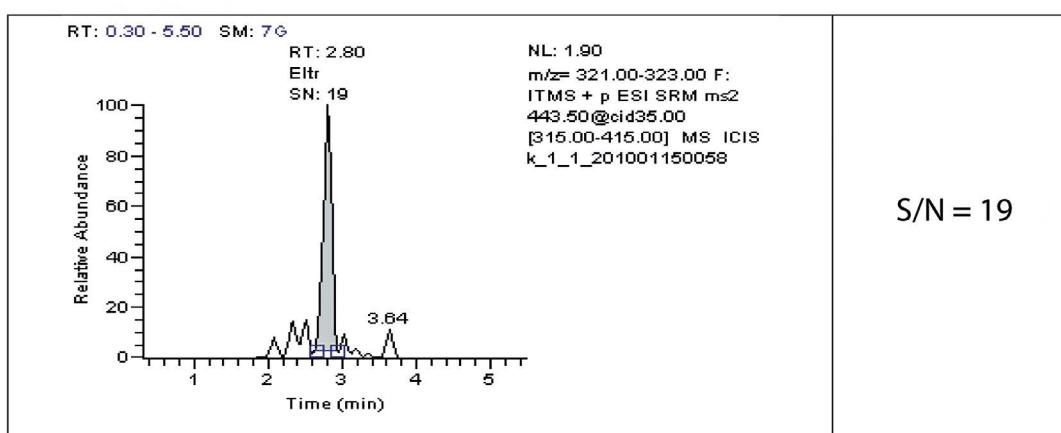
Изучена стабильность образцов, используемых на всех этапах биоаналитической методики. Краткосрочная стабильность: образцы стабильны после разморозки в течении 4 часов, финальные растворы стабильны в автосамплере 8 часов, образцы выдерживают 3 цикла разморозки/заморозки. Долгосрочная стабильность: стабильность испытуемых образцов подтверждена в течении 120 суток при температуре хранения  $-70^{\circ}\text{C}$  и 45 суток при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Все исход-

ные растворы стабильны в течении всего времени использования (таблицы 12–14).

**Таблица 12. Краткосрочная стабильность в период – с момента размораживания до финальной пробоподготовки**

**Table 12. Short-term stability during the period – from the moment of thawing to the final sample preparation**

Раствор Solution	$C_{\text{найд.ср}}/\text{нг/мл}$ $C_{\text{found cp}}/\text{ng/ml}$	4 часа хранения после стадии (МО ЭЛТР 05-20_Шаг 1) 4 hours storage after stage (MO ELTR 05-20 Step 1)		Критерий приемлемости Acceptance criterion
		$C_{\text{найд.ср}}/\text{нг/мл}$ $C_{\text{found cp}}/\text{ng / ml}$	Ошибка, % E, %	
HKK LQC	31	32	3	Не более 15 % No more than 15 %
BKK HQC	6990	7115	2	Не более 15 % No more than 15 %



**Рисунок 5. Расчет предела количественного определения элтромбопага**

**Figure 5. Calculation of the quantification limit for Eltrombopag**

**Таблица 13. Стабильность испытуемых растворов после финальной пробоподготовки при хранении в автосэмплере  $+4^{\circ}\text{C}$**

**Table 13. Stability of the tested solutions after the final sample preparation when stored in an auto sampler  $+4^{\circ}\text{C}$**

Раствор Solution	0 часов хранения в автосамплере 0 hours storage in auto sampler		4 часов хранения в автосамплере 4 hours storage in auto sampler		8 часов хранения в автосамплере 8 hours storage in auto sampler		CV, %	Критерий приемлемости Acceptance criterion
	$C_{\text{найд.ср}}/\text{нг/мл}$ $C_{\text{found cp}}/\text{ng/ml}$	$C_{\text{найд.ср}}/\text{нг/мл}$ $C_{\text{found cp}}/\text{ng/ml}$	Ошибка, % E, %	$C_{\text{найд.ср}}/\text{нг/мл}$ $C_{\text{found cp}}/\text{ng/ml}$	Ошибка, % E, %			
HKK LQC	31	30	-2	30	-1	1	1	Не более 15 % No more than 15%
BKK HQC	6990	7032	1	6984	0	0	0	Не более 15 % No more than 15%

**Таблица 14. Долгосрочная стабильность при естественных условиях хранения**

**Table 14. Long-term stability under natural storage conditions**

Раствор solution	$C_{\text{введ.}} \text{ нг/мл}$ $C_{\text{Injected}} \text{ ng/ml}$	Точка 0 Point 0		Хранение 30 суток Storage 30 days		Хранение 45 суток Storage 45 days		Хранение 120 суток Storage 120 days		CV, %	Критерий приемлемости Acceptance criterion
		$C_{\text{найд.-ср}} \text{ нг/мл}$ $C_{\text{found-cr}} \text{ ng/ml}$	Ошибка, % $E, \%$	$C_{\text{найд.-ср}} \text{ нг/мл}$ $C_{\text{found-cr}} \text{ ng/ml}$	Ошибка, % $E, \%$	$C_{\text{найд.-ср}} \text{ нг/мл}$ $C_{\text{found-cr}} \text{ ng/ml}$	Ошибка, % $E, \%$	$C_{\text{найд.-ср}} \text{ нг/мл}$ $C_{\text{found-cr}} \text{ ng/ml}$	Ошибка, % $E, \%$		
HKK (хранение при -20 °C) LQC (storage at -20 °C)	30	30	0	30	-2,7	28	-7	-	-	3	Не более 15 % No more than 15 %
HKK (хранение при -70 °C) LQC (storage at -70 °C)	30	29	-6	30	-1	29	-3	-	-	2	Не более 15 % No more than 15 %
BKK (хранение при -20 °C) HQC (storage at -20 °C)	6748	6954	3	6712	-1	6796	1	6724	0	2	Не более 15 % No more than 15 %
BKK (хранение при -70 °C) HQC (storage at -70 °C)	6748	6947	3	6839	1	6839	1	6755	0	1	Не более 15 % No more than 15 %

При изучении стабильности образцов не было найдено каких-либо ошибок, превышающих допустимые пределы, данные образцы были стабильны после разморозки в течении 4 часов. Дальнейшее изучение более 4 часов не rationalально, так как на пробо-подготовку одной серии уходит не более 1,0 часа (при крайних вариантах).

### Эффект переноса (carry-over)

Анализ калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови демонстрирует отсутствие пиков, которые соответствовали по временам удерживания пикам исследуемых веществ и внутреннего стандарта с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. На хроматограммах холостой матрицы после ввода раствора с максимальной концентрацией ( $k_8$ ) пики определяемых веществ отсутствуют. Эффект переноса также отсутствует. Результаты представлены на рисунке 6.

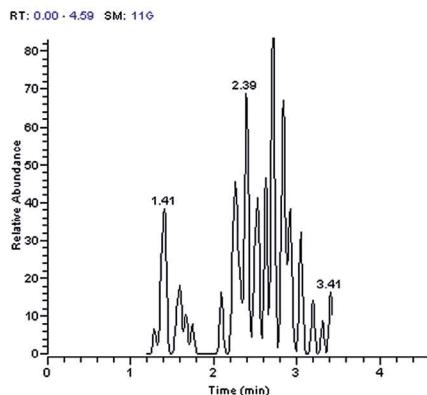
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые был успешно разработан и апробирован высокоселективный метод ВЭЖХ МС/МС для определения элтромбопага в плазме крови человека. Аналитическое время этого метода составляло 5,5 мин, что было быстрее, чем у обычного метода ВЭЖХ, и в этом методе наблюдалась высокая чувствительность (НПКО для элтромбопага составлял 10 нг в 1 мл плазмы крови). При исследовании аналитического ди-

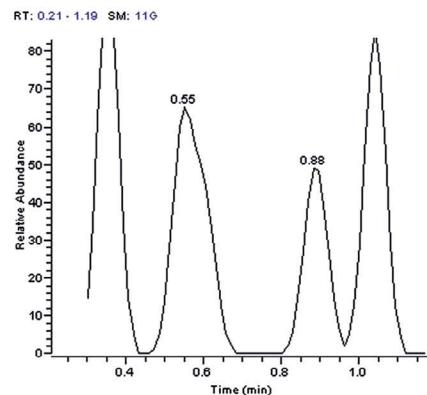
апазона препарат элтромбопаг в плазме составил 10–6750 нг/мл. Эффект матрицы был нормализованный НКК – 3,6 %, ВКК – 4,1 %. «Элтромбопаг» стабилен в плазме крови в течение 4 часов при комнатной температуре, 8 часов после подготовки образца, трех циклов замораживания/оттаивания и 120 дней при температуре хранения -70 °C. Диапазон правильности находится внутри и между аналитическими циклами в соответствии с максимальными отклонениями для внутрисерийных 89,1–106,7 % и для межсерийных: 98,3–102,6 %. Диапазон прецизионности был для внутрисерийных: 2,3 –7,0 % и для межсерийных: 2,8–3,4 %. Простое и быстрое осаждение белка использовалось для извлечения образцов перед анализом ВЭЖХ МС/МС. Метод показал хорошую правильность, прецизионность и широкий линейный диапазон концентраций. Следовательно, этот метод является «золотым стандартом» для получения достоверных, надёжных и точных результатов клинического исследования в области фармакокинетики.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ahmed M. A., Yassin M. A. Low-Dose Eltrombopag in a Patient with Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Post Sleeve Gastrectomy. *Case Rep. Oncol.* 2020;(13):655–658. DOI: 10.1159/000507755.
2. AL-Dhuraibi A. M., Pokrovskiy M. V. Evaluation of Eltrombopag Efficacy in Patients with Hepatitis C-induced Thrombocytopenia: Systematic Reviews of Meta-Analysis. *NVEO-NATURAL VOLATILES Essent. OILS Journal NVEO.* 2021;5453–5471.

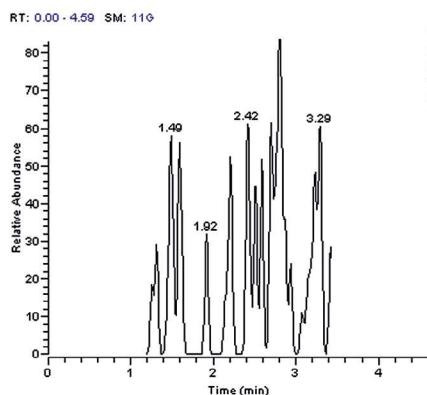


**Диапазон сканирования элтромбопага**  
Eltrombopag scan range

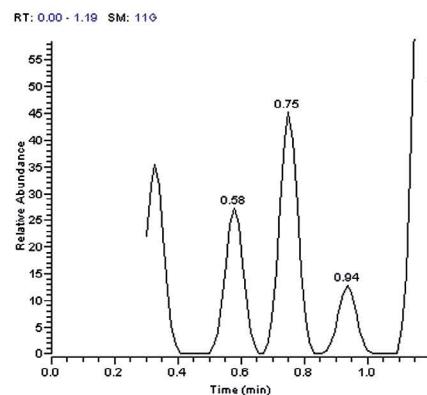


**Диапазон сканирования внутреннего стандарта**  
IS scan range

**Первая серия эксперимента (холостая матрица)**  
The first series of experiments (blank matrix)

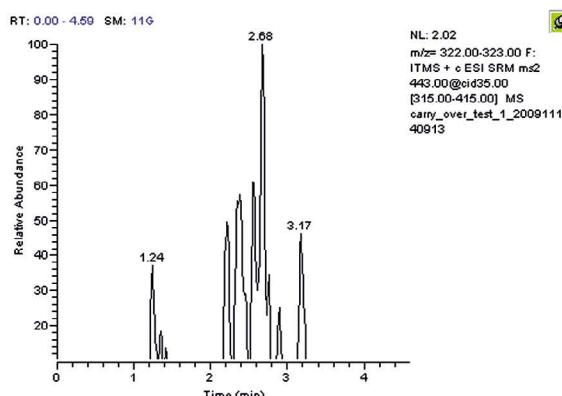


**Диапазон сканирования элтромбопага**  
Eltrombopag scan range

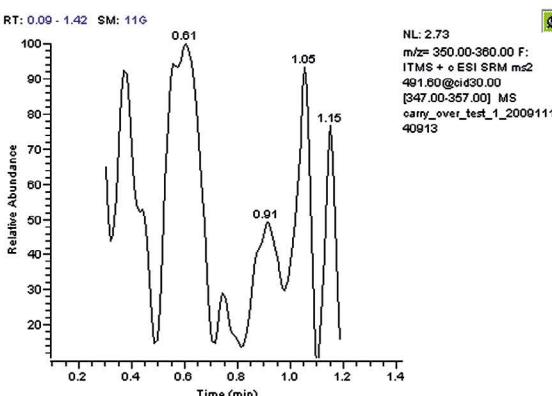


**Диапазон сканирования внутреннего стандарта**  
IS scan range

**Вторая серия эксперимента (холостая матрица)**  
The second series of experiments (blank matrix)



**Диапазон сканирования элтромбопага**  
Eltrombopag scan range



**Диапазон сканирования внутреннего стандарта**  
IS scan range

**Третья серия эксперимента (холостая матрица)**  
The third series of experiments (blank matrix)

**Рисунок 6. Результаты анализа калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови**

**Figure 6. Results of analysis of calibration samples and intact blood plasma sample**

3. Marano M., Serafinelli J., Cairoli S., Martinelli D., Pisani M., Palumbo G., Cefalo M. G., Cecchetti C., Di Nardo M., Falvella F. S., Gofredo B. M. Eltrombopag-Induced Acute Liver Failure in a Pediatric Patient: A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2018;40(4):386–388. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000522.
4. Yanagimachi N., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Chiba S., Doki K., Homma M. A simple HPLC assay for determining eltrombopag concentration in human serum. *Biomedical Chromatography*, 2021;35(5):e5049. DOI: 10.1002/bmc.5049.
5. Bauman J. W., Vincent C. T., Peng B., Wire M. B., Williams D. D., Park J. W. Effect of hepatic or renal impairment on eltrombopag pharmacokinetics. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;51(5):739–750. DOI: 10.1177/0091270010372106.
6. Cheng T. H. T., Tsui T. K. C., Kwok J. S. S., Lit L. C. W., Wong E. Y. L., Kam R. K. T., Grote-Koska D., Staaden A., Okada H., Fuke N., Wong R. S. M., Li C.-K., Chan M. H. M. Comprehensive characterization and resolution of discrepant spectrophotometric bilirubin results in patients on eltrombopag therapy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2020;58(10):1713–1723. DOI: 10.1515/cclm-2019-0684.
7. Jayagopal B., Murugesh S. QBD-driven HPLC method of eltrombopag olamine: Degradation pathway proposal, structure elucidation, and in silico toxicity prediction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;203:114231. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114231.
8. Maddela R., Gajula R., Pilli N. R., Siddiraju S., Maddela S., Makula A., Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for eltrombopag in 50 µL of human plasma: A pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;98:68–73. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.028.
9. Mohan T. S. S. J., Mukkanti K., Jogia H. A. Stability indicating UHPLC method, development and validation for estimation of eltrombopag and related impurities in tablet dosage form. *Oriental journal of chemistry*. 2018;34(2):1098–10104. DOI: 10.13005/ojc/340262.
10. Gosai S., Jadav K., Stability indicating analytical method development and validation of eltrombopag olamine in tablet dosage form by RP-UPLC. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*. 2020;7(3):845–850. DOI: 10.18596/jotcsa.724484.
11. Mayank S., Geeta V., Chaudhari P. S., Suleman S. K. Department. European of Biomedical AND Pharmaceutical sciences. development and validation of stability indicating rp-hplc method for estimation of eltrombopag olamine in. *Eur J Biomed Eur J Biomed Pharm Sci*. 2018;5(11):454–460.
12. Wire M. B., Bruce J., Gauvin J., Pendry C. J., McGuire S., Qian Y., Brainsky A. A randomized, open-label, 5-period, balanced crossover study to evaluate the relative bioavailability of eltrombopag powder for oral suspension (PfOS) and tablet formulations and the effect of a high-calcium meal on eltrombopag pharmacokinetics when admin. *Clinical therapeutics*. 2012;34(3):699–709. DOI: 10.1016/j.clinthera.2012.01.011.
13. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. T. II. Moscow: Grif i K; 2013. 280 p. (In Russ.)



Оригинальная статья / Research article

## Апробация модели жировой дистрофии печени, индуцированной оротовой кислотой

**В. Е. Ковансков<sup>✉</sup>, Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко, Г. А. Плиско, Е. А. Копачёва, К. О. Сидоров**

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

<sup>✉</sup> Контактное лицо: Ковансков Владислав Евгеньевич. E-mail: vladislav.kovanskov@spcpu.ru

ORCID: В. Е. Ковансков – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Е. Д. Семивеличенко – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; Г. А. Плиско – <https://orcid.org/0000-0003-0869-3430>; Е. А. Копачёва – <https://orcid.org/0000-0003-2241-0724>; К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Статья поступила: 09.06.2022

Статья принята в печать: 23.09.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** Для терапии неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) активно используют препараты-гепатопротекторы. Существующие модели неалкогольной жировой болезни печени, применяемые для изучения эффективности лекарственных препаратов, характеризуются большой длительностью воспроизведения и высокой смертностью тест-систем, в связи с чем актуальной задачей является апробация скрининговой модели данной патологии. В ряде исследований показана гепатотоксическая активность оротовой кислоты (OK), видоспецифичная для крыс, приводящая к развитию НАЖБП.

**Цель.** Апробация модели НАЖБП, индуцированной оротовой кислотой на 2 видах грызунов (мыши и крысы), изучение обратимости патологии под действием референтного препарата (уродезоксихолевая кислота – УДХК).

**Материалы и методы.** Исследование проведено на аутбредных крысах самцах массой 260–265 г ( $n = 21$ ) и инбредных мышах самцах линии C57BL/6 массой 16–18 г ( $n = 30$ ). Методом рандомизации крысы были разделены на 3 группы (по 7 крыс в каждой): 1-я группа – интактные животные; 2-я – модель НАЖБП; 3-я – модель НАЖБП + УДХК; мыши были разделены на 2 группы (по 10 и 20 мышей соответственно): 1-я группа – интактные животные; 2-я – модель НАЖБП. НАЖБП моделировали высокоуглеводной диетой с оротовой кислотой (75 % стандартный корм, 24 % фруктозы и 1 % оротата калия). УДХК вводили после первой контрольной точки 1 раз в день через зонд в пересчете 150 мг/кг. Проведено биохимическое и гистологическое исследование.

**Результаты и обсуждение.** Выявлено, что высокоуглеводная диета с добавлением 1 % оротата калия в течение 4 недель вызывает средневыраженную баллонную дистрофию, слабовыраженный гепатит и увеличение содержания аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в крови у крыс и менее значимые изменения у мышей. Также отмечена низкая смертность животных. Применение УДХК на заявленной модели вызывает уменьшение выраженности дистрофии печени и снижение уровня печеночных ферментов в крови.

**Заключение.** На основании проведенных экспериментов оптимальной тест-системой на воспроизведенной модели оказались крысы, а высокожировая диета с добавлением оротовой кислоты позволяет осуществлять скрининговые исследования препаратов с гепатотропной активностью.

**Ключевые слова:** НАЖБП, уродезоксихолевая кислота, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, баллонная дистрофия, гепатит

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

**Вклад авторов.** В. Е. Ковансков и Е. А. Копачёва осуществляли уход за лабораторными животными и непосредственное проведение экспериментов. Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко, Г. А. Плиско и К. О. Сидоров принимали участие в постановке эксперимента и написании статьи. В. Е. Ковансков и Д. Ю. Ивкин осуществляли первичную и финальную обработку полученных данных и описание полученных результатов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**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:** Ковансков В. Е., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А., Копачёва Е. А., Сидоров К. О. Апробация модели жировой дистрофии печени, индуцированной оротовой кислотой. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):240–245. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-240-245>

## Approbation of a Model of Fat Liver Disease Induced by Orotic Acid

**Vladislav V. Kovanskov<sup>✉</sup>, Dmitrij Yu. Ivkin, Evgeny D. Semivelichenko, Grigory A. Plisko, Ekaterina A. Kopacheva, Kirill O. Sidorov**

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

<sup>✉</sup> Corresponding author: Vladislav V. Kovanskov. E-mail: vladislav.kovanskov@spcpu.ru

ORCID: Vladislav V. Kovanskov – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>; Dmitrij Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Evgeny D. Semivelichenko – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; Grigory A. Plisko – <https://orcid.org/0000-0003-0869-3430>; Ekaterina A. Kopacheva – <https://orcid.org/0000-0003-2241-0724>; Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Received: 09.06.2022

Revised: 23.09.2022

Published: 25.11.2022

© Ковансков В. Е., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А., Копачёва Е. А., Сидоров К. О., 2022  
© Kovanskov V. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Plisko G. A., Kopacheva E. A., Sidorov K. O., 2022

## Abstract

**Introduction.** For the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), hepatoprotective drugs are actively used. The existing models of non-alcoholic fatty liver disease used to study the effectiveness of medicinal products are characterized by a long duration of recovery and high mortality of test systems, in connection with which, the actual task is to test the screening model of this pathology. A number of studies have shown the hepatotoxic activity of orotic acid (OK), species-specific for rats, leading to the development of NAFLD.

**Aim.** Approbation of the NAFLD model induced by orotic acid on 2 rodent species (mice and rats), research of the reversibility of pathology under the action of a reference drug (ursodeoxycholic acid – UDCA).

**Materials and methods.** The research was conducted on outbred male rats weighing 260–265 g ( $n = 21$ ) and inbred male mice of the C57BL/6 line weighing 16–18 g ( $n = 30$ ). By randomization, the rats were divided into 3 groups (7 rats each): group 1 – intact animals; group 2 – NAFLD model; group 3 – NAFLD + UDCA model, mice were divided into 2 groups (10 and 20 mice, respectively): group 1 – intact animals; group 2 – NAFLD model. NAFLD was modeled by a high-carbohydrate diet with orotic acid (75 % standard feed, 24 % fructose and 1 % potassium orotate). UDCA was administered after the first control point 1 time a day through a probe in terms of 150 mg/kg. Biochemical and histological examination was carried out.

**Results and discussion.** It was revealed that a high-carbohydrate diet with the addition of 1 % potassium orotate for 4 weeks causes moderate balloon dystrophy, mild hepatitis and an increase in the content of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in the blood of rats and less significant changes in mice. Low animal mortality was also noted. The use of UDCA on the claimed model causes a decrease in the severity of liver dystrophy and a decrease in the level of liver enzymes in the blood.

**Conclusion.** Based on the conducted experiments, rats turned out to be the optimal test system on the reproduced model, and a high-fat diet with the addition of orotic acid allows screening studies of drugs with hepatotropic activity.

**Keywords:** NAFLD, ursodeoxycholic acid, alanine aminotransferase, aspartate-minotransferase, balloon dystrophy, hepatitis

**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.** Vladislav E. Kovanskov and Ekaterina A. Kopacheva took care of laboratory animals and conducted experiments directly. Dmitrij Yu. Ivkin, Evgeny D. Semivelichenko and Grigory A. Plisko took part in setting up the experiment and writing the article. Vladislav E. Kovanskov and Dmitrij Yu. Ivkin carried out the primary and final processing of the data obtained and the description of the results obtained. All the authors participated in the discussion of the results.

**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:** Kovanskov V. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Plisko G. A., Kopacheva E. A., Sidorov K. O. Approbation of a model of fat liver disease induced by orotic acid. *Drug development & registration.* 2022;11(4):240–245. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-240-245>

## ВВЕДЕНИЕ

НАЖБП в настоящее время является одной из самых актуальных для исследования патологий печени, распространенность которой в мире варьирует от 6,3 до 33 %, в среднем 24 % [1]. НАЖБП объединяет в себе различные морфофункциональные изменения в печени, связанные с избыточным накоплением жиров в гепатоцитах, тесно связанных с ожирением и метаболическим синдромом [2, 3].

В большинстве случаев жировая дистрофия печени характеризуется непрогрессирующим течением с благоприятным прогнозом, но нередки случаи прогрессирования развития патологии, переходящей в цирроз, поэтому изучение НАЖБП является актуальным направлением и требует развития доступных и качественных моделей, воспроизводимых в короткие сроки [4].

Существующие методики воспроизведения НАЖБП связаны с высоким риском смерти животных и большой продолжительностью моделирования [5, 6], по-

этому целью работы стала апробация краткосрочной доклинической (скрининговой) модели НАЖБП [7, 8].

Для терапии неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) активно используют препараты-гепатопротекторы [9]. В ряде исследований показано гепатотоксическое действие оротовой кислоты, способной индуцировать НАЖБП у грызунов [10–13]. В качестве препарата-гепатопротектора использовалась УДХК, широко применяемая в практике при лечении различных заболеваний печени [14].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на аутбредных крысах самцах массой 260–265 г ( $n = 21$ ) и инбредных мышах самцах линии C57BL/6 массой 16–18 г ( $n = 30$ ). Методом рандомизации крысы были разделены на 3 группы (по 7 крыс в каждой): 1-я группа – интактные животные; 2-я – модель НАЖБП; 3-я – модель НАЖБП + УДХК; мыши были разделены на 2 группы (10 и 20 мышей

соответственно): 1-я группа – интактные животные; 2-я – модель НАЖБП. Исследуемый препарат вводили после первой контрольной точки 1 раз в день через зонд в дозе 150 мг/кг. Расчет дозировок препарата для введения животным проводили при помощи коэффициентов пересчета доз для крысы и человека в зависимости от массы тела по E. J. Freireich (1966) [15].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, DC, 1996) и Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (Rats-01-NASH-21 и Mice-02-NASH-21).

НАЖБП моделировали, сочетая высокоуглеводную диету и введение оротовой кислоты (в форме оротата калия) в течение 4 недель. В состав диеты входили 75 % лабораторного корма, 24 % фруктозы и 1 % оротата калия. Интактные животные получали стандартный комбикорм.

В ходе эксперимента оценивали летальность, а также массу тела животных (1 раз в 2 недели). В точке, соответствующей 4 неделям эксперимента (1 контрольная точка), выводили вторую группу крыс и вторую группу мышей, брали кровь с последующим биохимическим анализом [определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатамино-трансферазы (АСТ)] и забирали печень для гистологического исследования. Третью группу крыс переводили на стандартный корм и ежедневное введение урсодезоксихолевой кислоты 150 мг/кг через зонд. Во 2-й контрольной точке (8 недель эксперимента) были выведены все оставшиеся животные. Эвтаназию животных проводили в соответствии с внутренним стандартизованным операционным протоколом путем усыпления углекислым газом в СО<sub>2</sub>-боксе модели THF3481-V01 (BIOSCAPE (EHRET), Германия) с последующим сливанием крови через гильотинирование. Проводили биохимическое исследование забранной крови. Уровень АЛТ и АСТ определяли по общепринятым методикам с помощью стандартных наборов реактивов на автоматическом биохимическом анализаторе ERBA XL-100 (Erba group, Чехия).

Полученные органы помещались в 10%-й забуференный формалин и фиксировались в течение 24 ч. Далее производилась вырезка образцов и помещение их в гистологические кассеты. Образцы тканей подвергались стандартной гистологической проводке в гистопроцессоре Thermo Scientific Excelsior AS (Thermo Shandon Limited, Англия), после чего происходила заливка в парафин и микротомия с использо-

ванием ротационного микротома. Срезы толщиной 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). Оценивали следующие признаки: выраженность баллонной, жировой и вакуольной дистрофии, степень активности гепатита (0 – отсутствие признака; 1 – слабо выраженный; 2 – умеренно выраженный; 3 – выраженный признак).

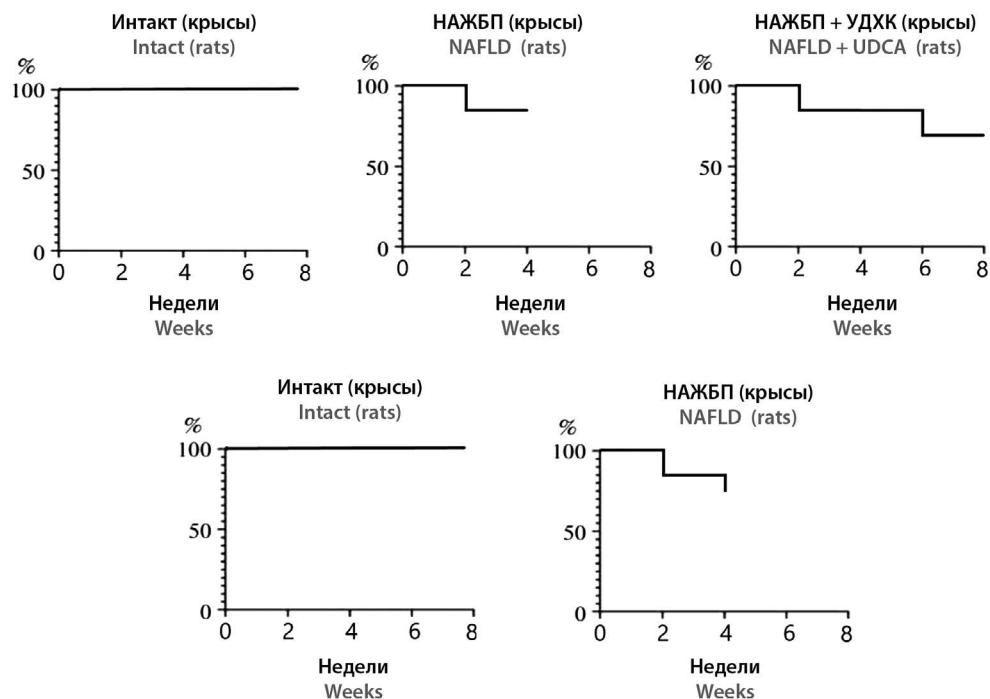
Статистическую проверку на нормальность распределения количественных признаков при малом числе наблюдений проводили с использованием W-критерия Шапиро – Уилка. С учетом распределения количественных данных, которое удовлетворяло критериям нормальности в качестве статистической обработки результатов исследования выполняли расчет средних значений и стандартных ошибок среднего ( $M \pm m$ ). Для оценки статистических различий применяли однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA), а статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали применения критерий Вилкоксона для связанных выборок. Анализ выживаемости выполнялся методом Каплана – Мейера. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.0.2. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатель общей смертности животных к окончанию 4-й недели эксперимента в контрольных группах крыс и мышей значимо не различался, составив соответственно 14,3 и 15 % (рисунок 1). При этом состояние мышей, несмотря на отсутствие высокой летальности, было крайне плохим, что заставило прекратить эксперимент с данной группой животных. В то же время в группе референтного препарата показатель летальности, равный 28,6 %, отмечался к концу 8 недели, а оставшиеся животные ( $n = 5$ ) были выведены из эксперимента во 2-й контрольной точке.

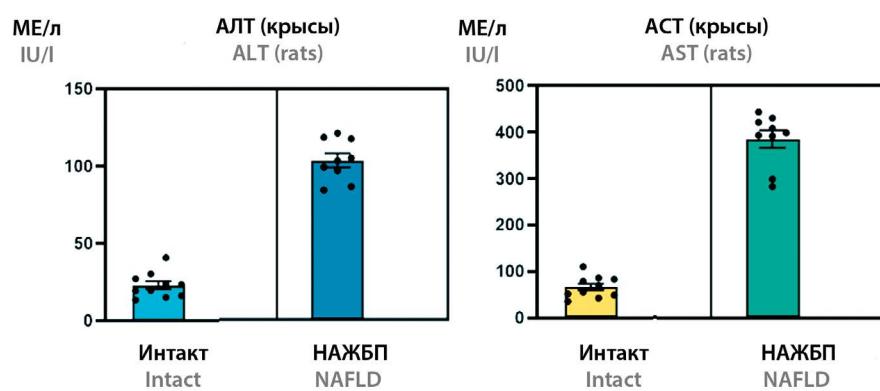
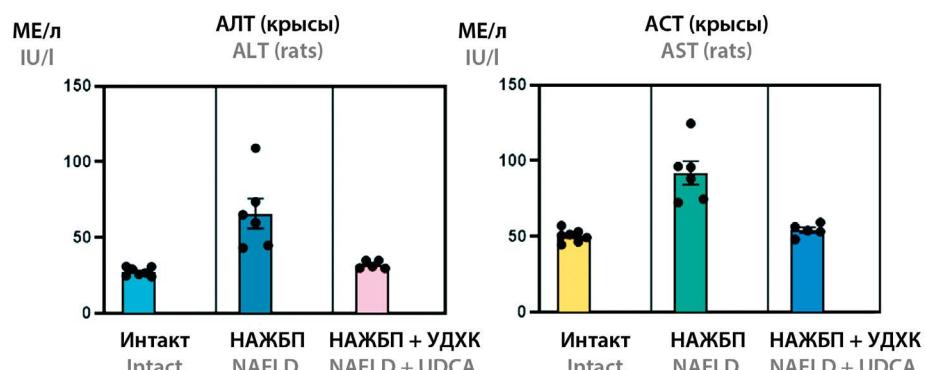
Масса тела экспериментальных животных статистически значимо не изменялась на протяжении эксперимента как внутри групп, так и между группами животных, находившихся на диете НАЖБП, НАЖБП + УДХК и интактными животными.

Как видно на рисунке 2, активность индикаторных ферментов цитолиза (АЛТ и АСТ) к первой контрольной точке эксперимента повышалась во вторых группах крыс и мышей по сравнению с группами интакта. Содержание АЛТ и АСТ в крови животных 3 группы крыс, получавших референтный препарат, ко второй экспериментальной точке снизилось в среднем на  $48,4 \pm 0,8\%$  ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 1. Выживаемость животных в исследуемых группах**

**Figure 1. Survival of animals in the study groups**



**Рисунок 2. Активность маркерных ферментов печени у животных исследуемых групп**

**Figure 2. Activity of liver marker enzymes in animals of the studied groups**

При оценке данных гистологического исследования печени методом балльной системы (1 – слабо выраженное проявление; 2 – умеренно выраженное, 3 – выраженное) после первой контрольной точки в контрольной группе мышей выявлено незначительное проявление баллонной дистрофии и гепатита. В то же время в контрольной группе крыс выявлено наличие умеренно выраженной баллонной дистрофии и слабовыраженного диффузного гепатита. После второй контрольной точки в группе крыс, принимающих референтный препарат, проявление баллонной дистрофии в печени не регистрировалось, гепатит гранулематозный и слабовыраженный (рисунок 3).

Полученные нами данные позволяют сделать вывод о влиянии диеты с повышенным содержанием углеводов в сочетании с оротовой кислотой на состояние печени крыс и мышей. Модель НАЖБП у крыс оказалась более выраженной, диета у крыс вызывает стойкое увеличение уровня АЛТ и АСТ в крови, свидетельствуя о повреждении клеток печени и снижении их работоспособности, что подтверждается данными гистологического исследования и кор-

релирует с выводами, полученными J. Eun-Jeong и соавт., показавшими причину межвидовых различий действия оротовой кислоты на крыс и мышей в ингибировании фосфорилирования аденоzinмонофосфат-активированной протеинкиназы оротовой кислотой в гепатоцитах крыс и отсутствие этого в гепатоцитах мышей [16].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам изложенного сделаны следующие выводы:

1. Диета с повышенным содержанием углеводов и 1 % оротовой кислоты за короткий срок вызывает патологические изменения в печени, схожие с НАЖБП.
2. Урсодезоксихолевая кислота успешно купирует проявления НАЖБП, индуцированной комбинацией оротовой кислоты и диеты, что позволяет рекомендовать ее в качестве референтного препарата и доказывает обратимость патологических изменений.

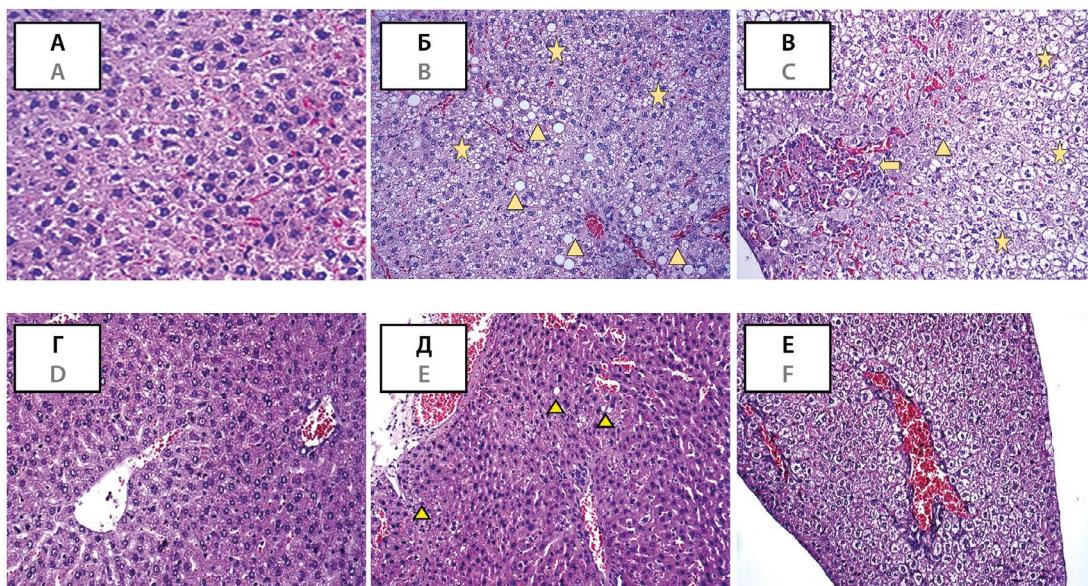


Рисунок 3. Морфологические изменения печени крыс и мышей в контрольных точках:

А – 1 контрольная точка (контрольная группа крыс), умеренно выраженная баллонная дистрофия гепатоцитов, слабо выраженная крупно-среднекапельная жировая дистрофия, диффузный слабо выраженный гепатит; Б – 1 контрольная точка (контрольная группа крыс), выраженная баллонная дистрофия гепатоцитов (звездочки), слабо выраженная крупно-среднекапельная жировая дистрофия, слабо выраженный грануломатозный гепатит; В – 2 контрольная точка (группа крыс референтного препарата), слабо выраженный грануломатозный гепатит; Г – 2 контрольная точка (группа крыс референтного препарата), умеренно выраженная баллонная дистрофия, слабо выраженная крупно-среднекапельная жировая дистрофия; Д – 1 контрольная точка (контрольная группа мышей) минимально выраженная средне-мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов; Е – 1 контрольная точка (контрольная группа мышей) слабо выраженная баллонная дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, ув.x200

Figure 3. Morphological changes in the liver of rats and mice at control points:

A – 1 control point (control group of rats), moderately pronounced balloon dystrophy of hepatocytes, weakly expressed large-medium-drop fatty dystrophy, diffuse weakly expressed hepatitis; B – 1 control point (control group of rats), pronounced balloon dystrophy hepatocytes (asterisks), weakly expressed large-medium-cap fatty dystrophy, weakly expressed granulomatous hepatitis; C – 2 control point (group of rats of the reference drug), mildly expressed granulomatous hepatitis; D – 2 control point (group of rats of the reference drug), moderately expressed balloon dystrophy, mildly expressed large-medium-cap fatty dystrophy; E – 1 control point (control group of mice) minimally expressed medium-fine-drop fatty dystrophy of hepatocytes; F – 1 control point (control group of mice) mild balloon dystrophy of hepatocytes. Stained with hematoxylin and eosin, uv.x200

3. Полученные данные позволяют рекомендовать указанную методику для дальнейшего использования в качестве быстровоспроизводимой модели НАЖБП.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Younossi Z., Anstee Q. M., Marietti M., Hardy T., Henry L., Eslam M. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2018;15:11–20. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109.
2. Буеверов А. О., Богомолов П. О., Маевская М. В. Патогенетическое лечение неалкогольного стеатогепатита: обоснование, эффективность, безопасность. *Терапевтический архив*. 2007;79(8):1–4.
3. Chang M., Zhang T., Han X., Tang Q., Yanagita T., Xu J., Xue C., Wang Y. Comparative Analysis of EPA/DHA-PL Forage and Liposomes in Orotic Acid-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Rats and Their Related Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(6):1408–1418. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05173.
4. Liu Y., Shi D., Tian Y., Liu Y., Zhan Q., Xu J., Wang J., Xue C. Eicosapentaenoic Acid-Enriched Phosphatidylcholine Attenuated Hepatic Steatosis Through Regulation of Cholesterol Metabolism in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Lipids*. 2017;52(2):119–127. DOI: 10.1007/s11745-016-4222-1.
5. Bunyat A., Spasenkova O., Karev V., Karavaeva A. V., Ivkin D., Kulikov A., Okovityi S., Kirillova N. Modification of a model of non-alcoholic fatty liver disease in rats with a combination of a hypercaloric diet and hypodynamia. *Pharmaceutical Medicine*. 2021;10:155–165. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-155-165.
6. Суханов Д. С., Ивкин Д. Ю., Плиско Г. А., Караваева А. В., Краснова М. В., Поверяева М. А., Карев В. Е., Бунят А. В., Степанова И. Л., Оковитый С. В. Влияние производного 2-этил-6-метил-3-гидроксиридида на течение неалкогольной жировой болезни в печени. *Молекулярная медицина*. 2020;18(1):23–25.
7. Zhengri L., Song H. L., Hee J. J., Hee E. K. Pharmacokinetic changes of clozapine and norclozapine in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease induced by orotic acid. *Xenobiotica*. 2021;51(3):324–334. DOI: 10.1080/00498254.2020.1851070.
8. Han X., Liu C., Xue Y., Wang J., Xue C., Yanagita T., Gao X., Wang Y. Long-term fatty liver-induced insulin resistance in orotic acid-induced nonalcoholic fatty liver rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2017;80(4):735–743. DOI: 10.1080/09168451.2015.1123608.
9. Rinella M., Cryer D. R., Articolo A., Fisher T., Schneider J., Nadolsky K. Nonalcoholic steatohepatitis medical patient journey from the perspective of hepatologists, gastroenterologists and patients: a cross-sectional survey. *BMC Gastroenterology*. 2022;22(1):335. DOI: 10.1186/s12876-022-02410-x.
10. Jiang Z., Kimura Y., Shirouchi B., Yuan X., Sato M. Dietary egg white protein hydrolysate improves orotic acid-induced fatty liver in rats by promoting hepatic phospholipid synthesis and microsomal triglyceride transfer protein expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021;98:108820. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2021.108820.
11. Hu Y., Xu J., Chen Q., Zhang Y., Wang T. Regulation effects of total flavonoids in *Morus alba* L. On hepatic cholesterol disorders in orotic acid induced NAFLD rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2020;20(117):257. DOI: 10.1186/s12906-020-03052-w.
12. Subali D., Kwon M. H., Bang W. S., Kang H. E. The pharmacokinetics of mycophenolic acid in rats with orotic acid induced nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020;98(3):169–176. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0383.
13. Bang W. S., Hwang Y. R., Li Z., Lee I., Kang H. E. Effects of orotic acid-induced non-alcoholic fatty liver on the pharmacokinetics of metoprolol and its metabolites in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2020;22:98–111. DOI: 10.18433/jpps30268.
14. Губергриц Б., Лукашевич Г. М., Фоменко П. Г. Гепатопротекторы: от теории к практике. М.: 4ТЕ Апр; 2012. 52 с.
15. Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P., Schmidt L. H., Skipper H. E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(4):219–244.
16. Jung E. J., Kwon S. W., Jung B. H., Oh S. H., Lee B. H. Role of the AMPK/SREBP-1 pathway in the development of orotic acid-induced fatty liver. *Jlr Res*. 2011;52(9):1617–1625. DOI: 10.1194/jlr.M015263.

## REFERENCES

1. Younossi Z., Anstee Q. M., Marietti M., Hardy T., Henry L., Eslam M. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2018;15:11–20. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109.
2. Bueverov A. O., Bogomolov P. O., Maevskaya M. V. Pathogenetic treatment of non-alcoholic steatohepatitis: rationale, efficacy, safety. *Therapeutic archive*. 2007;79(8):1–4. (In Russ.)
3. Chang M., Zhang T., Han X., Tang Q., Yanagita T., Xu J., Xue C., Wang Y. Comparative Analysis of EPA/DHA-PL Forage and Liposomes in Orotic Acid-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Rats and Their Related Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(6):1408–1418. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05173.
4. Liu Y., Shi D., Tian Y., Liu Y., Zhan Q., Xu J., Wang J., Xue C. Eicosapentaenoic Acid-Enriched Phosphatidylcholine Attenuated Hepatic Steatosis Through Regulation of Cholesterol Metabolism in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Lipids*. 2017;52(2):119–127. DOI: 10.1007/s11745-016-4222-1.
5. Bunyat A., Spasenkova O., Karev V., Karavaeva A. V., Ivkin D., Kulikov A., Okovityi S., Kirillova N. Modification of a model of non-alcoholic fatty liver disease in rats with a combination of a hypercaloric diet and hypodynamia. *Pharmaceutical Medicine*. 2021;10:155–165. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-155-165.
6. Sukhanov D. S., Ivkin D. Yu., Plisko G. A., Karavaeva A. V., Krasnova M. V., Povertyeva M. A., Karev V. E., Bunyat A. V., Stepanova I. L., Okovityi S. V. Influence of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine derivative on the course of non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Medicine*. 2020;18(1):23–25. (In Russ.)
7. Zhengri L., Song H. L., Hee J. J., Hee E. K. Pharmacokinetic changes of clozapine and norclozapine in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease induced by orotic acid. *Xenobiotica*. 2021;51(3):324–334. DOI: 10.1080/00498254.2020.1851070.
8. Han X., Liu C., Xue Y., Wang J., Xue C., Yanagita T., Gao X., Wang Y. Long-term fatty liver-induced insulin resistance in orotic acid-induced nonalcoholic fatty liver rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2017;80(4):735–743. DOI: 10.1080/09168451.2015.1123608.
9. Rinella M., Cryer D. R., Articolo A., Fisher T., Schneider J., Nadolsky K. Nonalcoholic steatohepatitis medical patient journey from the perspective of hepatologists, gastroenterologists and patients: a cross-sectional survey. *BMC Gastroenterology*. 2022;22(1):335. DOI: 10.1186/s12876-022-02410-x.
10. Jiang Z., Kimura Y., Shirouchi B., Yuan X., Sato M. Dietary egg white protein hydrolysate improves orotic acid-induced fatty liver in rats by promoting hepatic phospholipid synthesis and microsomal triglyceride transfer protein expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2021;98:108820. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2021.108820.
11. Hu Y., Xu J., Chen Q., Zhang Y., Wang T. Regulation effects of total flavonoids in *Morus alba* L. On hepatic cholesterol disorders in orotic acid induced NAFLD rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2020;20(117):257. DOI: 10.1186/s12906-020-03052-w.
12. Subali D., Kwon M. H., Bang W. S., Kang H. E. The pharmacokinetics of mycophenolic acid in rats with orotic acid induced nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020;98(3):169–176. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0383.
13. Bang W. S., Hwang Y. R., Li Z., Lee I., Kang H. E. Effects of orotic acid-induced non-alcoholic fatty liver on the pharmacokinetics of metoprolol and its metabolites in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2020;22:98–111. DOI: 10.18433/jpps30268.
14. Gubergrits B., Lukashevich G. M., Fomenko P. G. Hepatoprotectors: from theory to practice. Moscow: 4TE Art; 2012. 52 p. (In Russ.)
15. Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P., Schmidt L. H., Skipper H. E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(4):219–244.
16. Jung E. J., Kwon S. W., Jung B. H., Oh S. H., Lee B. H. Role of the AMPK/SREBP-1 pathway in the development of orotic acid-induced fatty liver. *Jlr Res*. 2011;52(9):1617–1625. DOI: 10.1194/jlr.M015263.



Оригинальная статья / Research article

## Клиническая апробация нового наноколлоидного радиофармпрепарата $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$ для диагностики сторожевых лимфатических узлов

А. А. Медведева<sup>1</sup>✉, В. И. Чернов<sup>1,2</sup>, Р. В. Зельчан<sup>1,2</sup>, О. Д. Брагина<sup>1,2</sup>,  
А. Н. Рыбина<sup>1</sup>, В. С. Скуридин<sup>2</sup>, Е. С. Стасюк<sup>2</sup>, С. Ю. Чижевская<sup>1</sup>,  
А. В. Гольдберг<sup>1</sup>, Е. Ю. Гарбуков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ РАН), 634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр «Онкотерапии». Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30

✉ Контактное лицо: Медведева Анна Александровна. E-mail: medvedeva@tnimc.ru

ORCID: А. А. Медведева – <https://orcid.org/0000-0003-2113-6436>; В. И. Чернов – <https://orcid.org/0000-0001-8753-7916>; Р. В. Зельчан – <https://orcid.org/0000-0002-4568-1781>;

О. Д. Брагина – <https://orcid.org/0000-0001-5281-7758>; А. Н. Рыбина – <https://orcid.org/0000-0002-6488-0647>; В. С. Скуридин – <https://orcid.org/0000-0002-1300-1980>;

Е. С. Стасюк – <https://orcid.org/0000-0003-4875-6555>; С. Ю. Чижевская – <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>; А. В. Гольдберг – <https://orcid.org/0000-0001-7829-2515>;

Е. Ю. Гарбуков – <https://orcid.org/0000-0002-6016-7078>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 24.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** В современной онкологической практике все больший интерес вызывает выявление сторожевых лимфатических узлов (СЛУ) – первых узлов, стоящих на пути метастазирования злокачественных новообразований. Выявление СЛУ с последующим морфологическим исследованием позволяет персонализировать объем хирургического вмешательства при раннем раке молочной железы, меланоме, опухолях головы и шеи, новообразованиях шейки матки и эндометрия. В настоящее время идет активный поиск специфичных радиофармпрепараторов (РФП) для визуализации СЛУ. В рамках гранта федеральной целевой программы «Фарма-2020» был разработан оригинальный РФП на основе гамма оксида алюминия –  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Были проведены доклинические исследования, которые продемонстрировали его эффективность и безопасность. Исследования фармакокинетики  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  показали, что через 24 часа после его подкожного введения около 12 % от введенной дозы аккумулируется в СЛУ, что позволяет адекватно производить их детекцию.

**Цель.** Изучить возможность применения  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  для визуализации СЛУ при раке молочной железы, гортани и гортаноглотки.

**Материалы и методы.** Определение СЛУ было проведено у 55 больных раком молочной железы и 30 пациентов со злокачественными опухолями гортани и гортаноглотки. Выполнение исследования включало в себя проведение паратуморальной инъекции РФП, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с последующим качественным и количественным анализом полученных изображений и интраоперационной детекции лимфатических узлов с их последующим морфологическим исследованием.

**Результаты и обсуждение.** Клинические исследования показали, что радионуклидная визуализация СЛУ с использованием  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  характеризуется высокой чувствительностью как при раке молочной железы, так и при раке гортани и гортаноглотки (94,5 и 90 % соответственно), за счет высокointенсивного накопления этого РФП в лимфатических узлах. Оптимальной временной точкой для проведения сцинтиграфического исследования после инъекции  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  является интервал 18–20 часов, что позволяет визуализировать максимально возможное количество лимфатических узлов с наиболее оптимальным уровнем радиоактивности для их детекции, как на томосцинтиграммах, так и интраоперационно.

**Заключение.** При планировании оперативного этапа лечения для определения объема хирургического вмешательства в алгоритм обследования пациентов с опухолями молочной железы, гортани и гортаноглотки целесообразно включать радионуклидную диагностику СЛУ с применением в качестве радиофармпрепарата  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$ .

**Ключевые слова:** сторожевой лимфатический узел, рак, молочная железа, гортань, гортаноглотка, радионуклидная диагностика

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

**Вклад авторов.** А. А. Медведева провела исследования, анализ и интерпретацию данных. В. И. Чернов, В. С. Скуридин разработали концепцию и дизайн. Р. В. Зельчан провел исследования, анализ материала. О. Д. Брагина, А. Н. Рыбина участвовали в написании текста статьи. Е. С. Стасюк провела синтез соединения, обработку данных, проведение исследований. С. Ю. Чижевская, Е. Ю. Гарбуков провели подбор клинического материала. А. В. Гольдберг провел исследования. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Соответствие принципам этики.** Исследование проводилось с одобрения локального комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 2 от 18.02.2019), все пациенты были включены в исследование на основании информированного добровольного согласия.

**Для цитирования:** Медведева А. А., Чернов В. И., Зельчан Р. В., Брагина О. Д., Рыбина А. Н., Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Чижевская С. Ю., Гольдберг А. В., Гарбуков Е. Ю., 2022  
© Medvedeva A. A., Chernov V. I., Zelchan R. V., Bragina O. D., Rybina A. N., Skuridin V. S., Stasyuk E. S., Chizhevskaya S. Yu., Goldberg A. V., Garbukov E. Yu., 2022

# Clinical Testing of a New Radiopharmaceutical [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$ for the Diagnosis of Sentinel Lymph Nodes

Anna A. Medvedeva<sup>1</sup>✉, Vladimir I. Chernov<sup>1,2</sup>, Roman V. Zelchan<sup>1,2</sup>, Ol'ga D. Bragina<sup>1,2</sup>,  
Anastasiya A. Rybina<sup>1</sup>, Victor S. Skuridin<sup>2</sup>, Elena S. Stasyuk<sup>2</sup>, Svetlana Yu. Chizhevskaya<sup>1</sup>,  
Aleksey V. Goldberg<sup>1</sup>, Evgeniy Yu. Garbukov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution «Tomsk National Research Center for Medicine by the Russian Academy of Sciences», 5, Kooperativny lane, Tomsk, 634009, Russia

<sup>2</sup> Research Center "Oncotheranostics". National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin ave., Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Anna A. Medvedeva. E-mail: medvedeva@tnimc.ru

**ORCID:** Anna A. Medvedeva – <https://orcid.org/0000-0003-2113-6436>; Vladimir I. Chernov – <https://orcid.org/0000-0001-8753-7916>; Roman V. Zelchan – <https://orcid.org/0000-0002-4568-1781>; Ol'ga D. Bragina – <https://orcid.org/0000-0001-5281-7758>; Anastasiya A. Rybina – <https://orcid.org/0000-0002-6488-0647>; Victor S. Skuridin – <https://orcid.org/0000-0002-1300-1980>; Elena S. Stasyuk – <https://orcid.org/0000-0003-4875-6555>; Svetlana Yu. Chizhevskaya – <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>; Aleksey V. Goldberg – <https://orcid.org/0000-0001-7829-2515>; Evgeniy Yu. Garbukov – <https://orcid.org/0000-0002-6016-7078>.

Received: 06.09.2022

Revised: 24.10.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** In modern oncology, the identification of sentinel lymph nodes (SLN), the first nodes that stand on the way of malignant tumor metastasis, is of increasing interest. Detection of SLN followed by morphological examination allows personalizing the surgical intervention for early breast cancer, melanoma, head and neck tumors, neoplasms of the cervix and endometrium. Currently, there is an active development of specific radiopharmaceuticals for SLN imaging. Within the framework of the grant from the Federal Target Program "Pharma-2020", an original radiopharmaceutical using gamma aluminum oxide – [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  was developed. Preclinical studies have been demonstrated its effectiveness and safety. Pharmacokinetic studies of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  showed that 24 hours after its subcutaneous administration, about 12 % of the administered dose is accumulated in the SLN, which gives possibility for its detection.

**Aim.** To study the possibility of clinical [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  using for visualization of SLN in breast, larynx and laryngopharyngeal cancer.

**Materials and methods.** The definition of SLN was carried out in 55 patients with breast cancer and 30 patients with malignant tumors of the larynx and laryngopharynx. The study included peritumoral radiopharmaceutical injection, single-photon emission computed tomography with qualitative and quantitative analysis of the images and radioguided surgery detection of lymph nodes with their subsequent morphological examination.

**Results and discussion.** Clinical studies have shown that radionuclide imaging of SLN using [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  is characterized by high sensitivity in breast cancer, larynx and laryngopharyngeal cancer patients (94.5 and 90 %, respectively), due to the high-intensity accumulation of this radiopharmaceutical in the lymph nodes. The optimal time point for SPECT and radioguided examination is an interval of 18–20 hours after injection of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$ , which allows visualizing the maximum possible number of lymph nodes with the most optimal level of radioactivity for their detection.

**Conclusion.** Application of radionuclide imaging of SLN with the use of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  as a radiopharmaceutical is useful in planning surgical treatment of patients with tumors of the breast, larynx and laryngopharynx to determine the extent of surgery.

**Keywords:** sentinel lymph node, cancer, mammary gland, larynx, laryngopharynx, nuclear medicine

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

**Contribution of the authors.** Anna. A. Medvedeva conducted research, analysis and interpretation of the data. Vladimir I. Chernov, Victor S. Skuridin developed the concept and design. Roman V. Zelchan conducted research and analysis of the material. Ol'ga D. Bragina, Anastasiya N. Rybina participated in writing the text of the article. Elena S. Stasyuk performed the synthesis of the compound, data processing, research. Svetlana Yu. Chizhevskaya, Evgeniy Yu. Garbukov conducted the selection of clinical material. Aleksey V. Goldberg conducted research. All authors participated in the discussion of the results.

**Compliance with the principles of ethics.** The study was conducted with the approval of the local committee on biomedical ethics of the Oncology Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center (protocol No. 2 dated February 18, 2019), all patients were included in the study on the basis of informed voluntary consent.

**For citation:** Medvedeva A. A., Chernov V. I., Zelchan R. V., Bragina O. D., Rybina A. A., Skuridin V. S., Stasyuk E. S., Chizhevskaya S. Yu., Goldberg A. V., Garbukov E. Yu. Clinical testing of a new radiopharmaceutical [ $^{99m}\text{Tc}$ ]- $\text{Al}_2\text{O}_3$  for the diagnosis of sentinel lymph nodes. *Drug development & registration*. 2022;11(4):246–252. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-246-252>

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время статус сторожевого (сигнального) лимфатического узла (СЛУ) является одним из важных прогностических факторов метастазирования опухоли [1–3]. Сигнальным лимфатическим узлом считается лимфоузел, находящийся на пути прямого лимфатического оттока от первичного опухолевого узла. Данная концепция основана на том, что лимфа-

тический отток от первичной опухоли распространяется сначала к сигнальному лимфатическому узлу, а затем к другим регионарным лимфоузлам [4]. Радионуклидный метод диагностики СЛУ позволяет точно определять его локализацию и в настоящее рассмотривается в качестве одного из наиболее динамично развивающихся методов ядерной медицины. Базовым радиофармацевтическим лекарственным препаратом (РФЛП) является меченный  $^{99m}\text{Tc}$  радио-

активный коллоид и основным критерием его оценки считается размер частиц – оптимальный размер может обеспечить быструю скорость выведения РФЛП из места инъекции и высокую ретенцию в СЛУ [5, 6]. Наиболее оптимальным для диагностики СЛУ был признан коллоид с размером частиц от 50 до 80 нм.

На сегодняшний день в России для визуализации СЛУ в практической онкологии используют фитатный коллоид «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» (ООО «Диамед», Россия) и коллоидный альбумин «<sup>99m</sup>Tc-Нанотоп» (ROTOP Pharmaka GmbH, Германия). При этом «<sup>99m</sup>Tc-Технефит» не зарегистрирован в качестве РФЛП для диагностики СЛУ, характеризуется чрезвычайно большим разбросом размера коллоидных частиц, с этим связан низкий уровень нодальной аккумуляции этого препарата (1–2 % от введенной дозы) и его способность перераспределяться в лимфатические узлы 2 и 3 порядка, что снижает диагностическую эффективность методики [7, 8]. Единственным РФЛП, зарегистрированным в РФ, для обнаружения сигнальных лимфатических узлов при раке молочной железы (РМЖ) и меланоме является «<sup>99m</sup>Tc-Нанотоп». Около 95 % частиц коллоидного альбумина, входящего в его состав имеют размер менее 80 нм, поэтому указанный РФЛП считается оптимальным для визуализации СЛУ. В то же время широкому применению «<sup>99m</sup>Tc-Нанотоп» в отечественной онкологии препятствует его высокая стоимость.

В Томском политехническом университете, совместно с НИИ онкологии Томского НИМЦ был разработан лиофилизат на основе гамма-оксида алюминия ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) для приготовления РФЛП –  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$ , который характеризуется оптимальным для проведения диагностики СЛУ размером наночастиц от 50 до 100 нм [9, 10]. В полном объеме были выполнены доклинические исследования этого РФЛП, которые продемонстрировали безопасность применения [11–13] и функциональную пригодность [14, 15]. Эксперименты показали, что уровень его аккумуляции в СЛУ превосходит аналоги в несколько раз (7–11 % от активности в точке введения).

**Целью данной работы** было изучение возможности применения  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  в клинической практике для визуализации СЛУ при раке молочной железы, гортани и гортаноглотки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленных задач в исследование было включено 85 пациентов, из них 55 больных раком молочной железы (РМЖ) и 30 больных раком гортани и гортаноглотки (РГГ). Критерием отбора для данного вида исследования у больных РМЖ являлся протоковый рак *in situ* и инвазивный рак в случае N<sub>0</sub> стадии, у больных РГГ стадия заболевания – T<sub>2–4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>. Алгоритм исследования включал в себя несколько этапов – инъекцию РФЛП, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОФЭКТ) и интра-

перационную детекцию регионарных лимфатических узлов с их удалением и последующим морфологическим исследованием.

Приготовление  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  проводилось в радионуклидной лаборатории согласно инструкции, утвержденной в НИИ онкологии Томского НИМЦ (от 26.04.16). Радиофармпрепарат вводился за день до операции паратуморально 20–30 МБк на каждую точку инъекции. Затем выполнялась ОФЭКТ на гамма-камере E.CAM 180 или ОФЭКТ/КТ на гамма-камере Symbia Intevo Bold™ (Siemens Healthineers, Германия) с последующим качественным и количественным анализом полученных изображений. Для интраоперационной детекции использовался коллимированный гамма-зонд Gamma Finder® II (США). Зарегистрированный уровень гамма-излучения отображается в числовых значениях (импульсы в секунду). Лимфатический узел с наибольшей активностью, по сравнению с остальными обнаруженными с помощью гамма-зонда лимфоузлами, либо единственный выявленный лимфоузел маркировался как сторожевой. После удаления СЛУ область регионарного лимфатического коллектора повторно исследовалась с помощью гамма-зонда. Таким образом, удалению подвергались непосредственно отмаркованные СЛУ, а также остальные выявленные гамма-зондом лимфатические узлы в проекции регионарного лимфатического коллектора. По данным интраоперационной радиометрии рассчитывался уровень аккумуляции радиоколлоида в проекции СЛУ (по отношению к месту инъекции, %). Полученный материал отправлялся на гистологическое исследование и лимфодиссекция выполнялась только в ситуациях, когда по его результатам было выявлено метастатическое поражение удаленных лимфатических узлов.

Для характеристики центральной тенденции в выборке рассчитывалась медиана Me [Q1 – Q3]. Анализировалась чувствительность метода, во внимание принималось количество пациентов, у которых отмечалось включение РФЛП в проекции лимфоузлов, референтным методом для анализа являлся результат гистологического исследования послеоперационного материала. Показатель чувствительности рассчитывался по формуле:

$$\text{ИП}/(\text{ИП} + \text{ЛО}) \times 100 \%,$$

где ИП (истинно положительный результат) – выявленный лимфатический узел с зафиксированной радиоактивностью; ЛО (ложноотрицательный результат) – отсутствие радиоактивности в регионарных лимфатических узлах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определяя временные промежутки для выполнения ОФЭКТ после инъекции  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$ , мы ориентировались на результаты доклинических исследований [14, 15]. Тем не менее, для оптимизации алгоритма проведения методики определения СЛУ 15 боль-

ным раком молочной железы ОФЭКТ была выполнена через 15 минут, 2 часа и 18–20 часов после введения РФЛП. Анализ полученных результатов показал, что наименьшее количество визуализируемых лимфатических узлов и наиболее низкая интенсивность аккумуляции  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  наблюдалась на томосцинтиграммах, выполненных через 15 минут после подкожного введения  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Через 18–20 часов отмечались максимальные показатели интенсивности накопления РФЛП (рисунок 1).

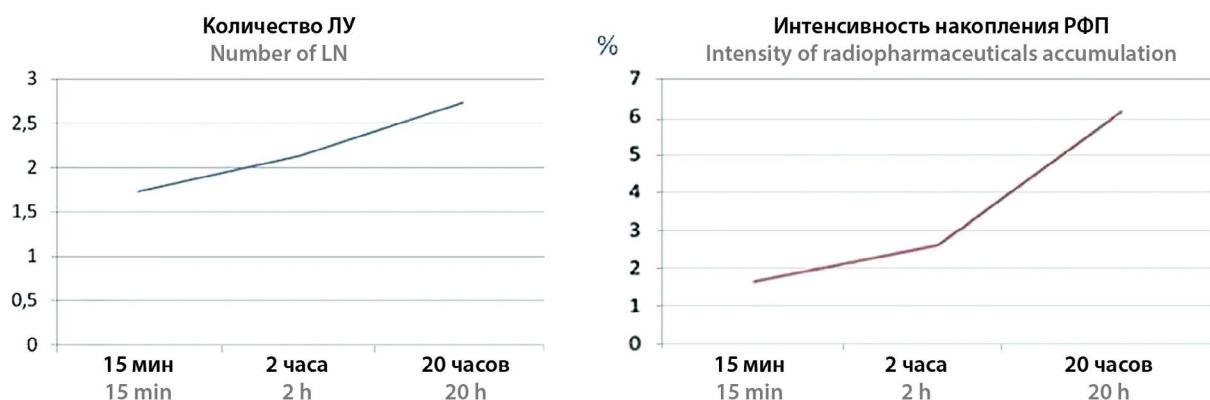
Полученные данные позволили нам сделать вывод о том, что оптимальной временной точкой для проведения ОФЭКТ является интервал 18–20 часов после введения  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  – это позволяет визуализировать максимально возможное количество лимфатических узлов с наиболее оптимальным уровнем радиоактивности для их детекции, как на томосцинтиграммах, так и интраоперационно.

Сторожевые лимфатические узлы были выявлены у 52 (94,5 %) из 55 вошедших в исследование пациенток, интраоперационно у всех этих больных также было зафиксировано включение  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  в ак-

силярной области. Выявленные СЛУ локализовались в аксилярной области (рисунок 2), как правило, уровень I-II ( $n = 48,0, 93,0 \%$ ), реже уровень III ( $n = 3,0, 5,8 \%$ ), у 6 пациенток (11,5 %) СЛУ относились к интрапекторальной группе, у 2 пациенток – парастернально.

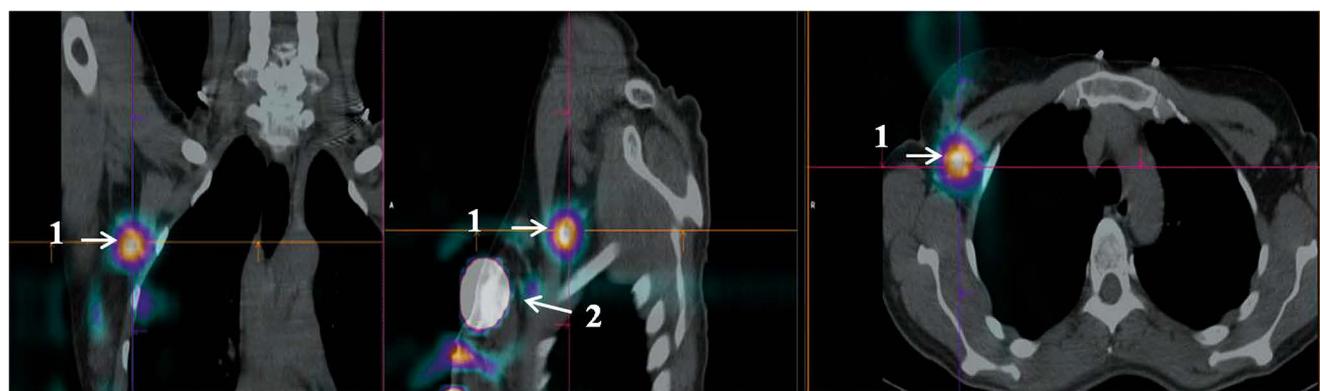
У 3 больных накопления РФЛП в проекции регионарных лимфоузлов отмечено не было – ни по данным ОФЭКТ, ни интраоперационно гамма-зондом и им была выполнена аксилярная лимфаденэктомия, результаты гистологического исследования показали, что в двух случаях СЛУ был totally замещен опухолевыми клетками. У одной пациентки СЛУ были интактны, однако молочные железы характеризовались наличием избыточной жировой ткани, что может быть причиной нарушения нормального лимфооттока от железы в целом, и от опухоли в частности, возможно, в виде выраженного его замедления, и как следствие, приводить к низкой чувствительности методики.

Всего было выявлено 111 лимфатических узлов, среднее количество выявленных лимфатических узлов у одной пациентки составило 2 [0–6], интенсив-



**Рисунок 1. Динамика изменения накопления  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  в лимфатических узлах в разные временные интервалы**

**Figure 1. Dynamics of changes in the accumulation of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  in the lymph nodes at different time intervals**



**Рисунок 2. Совмещенное ОФЭКТ/КТ исследование больной раком правой молочной железы:**

1 – накопление радиофармпрепарата в проекции аксилярного лимфатического узла; 2 – место инъекции

**Figure 2. SPECT/CT examination of the patient with breast cancer:**

1 – accumulation of the radiopharmaceutical in the axillary lymph node; 2 – injection site

ность накопления  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  по данным ОФЭКТ – 6,1 [0,5–18,4], интраоперационно – 7,2 [1,3–22,1]. После планового гистологического исследования удаленных лимфатических узлов метастатическое поражение было выявлено у 15 (27,3 %) пациенток, у остальных больных СЛУ были интактны. Чувствительность радионуклидной диагностики СЛУ у больных раком молочной железы с применением  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  составила 94,5 %.

При опухолях гортани и гортаноглотки в 86,7 % случаях визуализировалась односторонняя локализация СЛУ, двухсторонняя локализация была выявлена у 13,3 % больных. В целом аккумуляция РФЛП в лимфатических узлах шеи определялась у 27 пациентов (90 %), в 10 % случаев (3 пациента) СЛУ не визуализировались, идентичные результаты были получены и во время интраоперационной детекции. Всего было выявлено 57 лимфоузлов, медиана количества визуализируемых СЛУ составила 1,5 [0–5], интенсивность накопления  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  по данным ОФЭКТ и интраоперационной детекции составило 4,8 [0,7–19,4] и 6 [1,1–22] соответственно. После планового гистологического исследования удаленных лимфатических узлов метастатическое поражение было выявлено у 3 пациентов, все пораженные лимфоузлы соответствовали стороне локализации первичной опухоли, этим пациентам впоследствии выполнялась лимфодиссекция, у 48 больных метастатическое поражение СЛУ отсутствовало. Чувствительность метода при использовании в качестве радиофармпрепарата  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  при раке гортани и гортаноглотки составила 90 %.

Несмотря на то, что метод радионуклидной визуализации СЛУ используется уже давно, тем не менее, до сих пор некоторые вопросы остаются спорными. В частности, какой же все-таки лимфатический узел считать сторожевым? Некоторые исследователи определяют СЛУ как первый лимфоузел, который визуализируется на сцинтиграммах. Однако доказано, что нередко два лимфатических сосуда берут начало в области первичной опухоли и лимфоотток идет, в итоге, в два разных лимфатических узла. При этом один из двух может определяться на сцинтиграммах раньше, чем другой, но это, естественно, не подразумевает, что второй лимфоузел не является сторожевым. Существует также мнение, что сторожевыми лимфатическими узлами следует считать все лимфатические узлы, накапливающие радиоколлоиды, вне зависимости от их удаленности от первичной опухоли [16]. В связи с этим открытым остается вопрос – сколько лимфоузлов следует брать для проведения биопсии при обнаружении нескольких узлов. Считается, что выполнение диагностики СЛУ подразумевает под собой удаление всех лимфатических узлов, получающих прямой дренаж из первичной опухоли, однако на практике это удается не всегда. У пациентов с множественными радиоактивно мечеными узлами часто трудно отличить СЛУ от узлов второго

уровня. При этом считается, что удаление более пяти узлов из аксилярной области при РМЖ не приводит к заметному улучшению чувствительности метода [17–19]. Поэтому при изучении возможностей коллоидных РФЛП, конечно, необходимо учитывать не только интенсивность их накопления в лимфатических узлах и в целом чувствительность метода, но также и количество визуализируемых лимфоузлов. Возможно, что использование РФЛП, которые накапливаются только в одном лимфоузле, приведет к снижению эффективности оценки состояния регионарного лимфатического коллектора. А перераспределение РФЛП в дистальные лимфатические узлы может приводить к неоправданно большим объемам хирургического вмешательства, и тогда выполнение диагностики СЛУ с целью уменьшения объема операции становится нецелесообразным.

Применение  $[^{99m}\text{Tc}]\text{-Al}_2\text{O}_3$  в качестве РФЛП для радионуклидной диагностики СЛУ, на наш взгляд, дает хирургам возможность использовать оптимальное количество лимфатических узлов для адекватной оценки состояния регионарного лимфатического коллектора.

Считается, что примерно у 1–2 % больных РМЖ сигнальный лимфоузел не будет визуализироваться до или во время операции. Причинами могут быть возраст пациента, наличие ожирения или неудачная локализация СЛУ, а также высокий риск метастатического поражения этих лимфоузлов [20, 21]. Можно полагать, что при отсутствии накопления коллоидного РФЛП в изучаемых лимфатических узлах и при обычном строении молочной железы можно ожидать тотальное метастатическое поражение СЛУ. А при проведении диагностики СЛУ у женщин с избыточной жировой тканью в области молочных желез необходимо учитывать возможность получения результатов с низкой чувствительностью. Тем не менее, эти особенности строения молочной железы не считаются ограничением к проведению диагностики СЛУ. В нашем исследовании у 5 женщин с подобным строением молочной железы проблем в визуализации и интраоперационной детекции СЛУ не наблюдалось. Максимальное количество лимфоузлов, которые мы смогли визуализировать у данной когорты пациенток – 4 лимфатических узла у одной больной.

Что касается опухолей гортани и гортаноглотки, мы считаем, что дальнейший набор материала с анализом безрецидивной выживаемости при использовании методики визуализации СЛУ является довольно перспективным направлением. Радионуклидная диагностика СЛУ при злокачественных опухолях головы и шеи в большей степени касается рака полости рта и основная масса исследований посвящена именно этой локализации. Это связано с более агрессивным течением данной патологии, особенностями лимфодренажа и сложностями выявления метастатического поражения регионарных лимфоузлов, особенно на ранних стадиях заболевания. Рак гортани и

гортаноглотки характеризуется меньшим риском метастазирования в лимфатические узлы, однако проблема органосохранных операций при данной локализации стоит довольно остро, в связи с чем достаточно актуальным является развитие направления адекватной оценки распространенности заболевания на дооперационном этапе у таких пациентов [22–24].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты демонстрируют, что радионуклидная диагностика СЛУ с применением в качестве радиофармпрепарата  $[^{99m}\text{Tc}] \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$  характеризуется оптимальным уровнем радиоактивности для детекции лимфатических узлов, как на томосцинтиграммах, так и интраоперационно. Кроме того, использование этого РФЛП позволяет визуализировать максимально возможное количество лимфатических узлов для оценки адекватного объема оперативного вмешательства у больных раком молочной железы, гортани и гортаноглотки. Данный метод целесообразно включать в алгоритм обследования онкологических пациентов при планировании оперативного этапа лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

- Boada A., Tejera-Vaquerizo A., Ribero S., Puig S., Moreno-Ramírez D., Quaglino P., Osella-Abate S., Cassoni P., Malvehy J., Carrera C., Pigem R., Barreiro-Capurro A., Requena C., Traves V., Manrique-Silva E., Fernández-Orland A., Ferrandiz L., García-Senosiain O., Fernández-Figueras M. T., Ferrández C., Nagore E. SENTIMEL study group. Factors associated with sentinel lymph node status and prognostic role of completion lymph node dissection for thick melanoma. *European Journal of Surgical Oncology*. 2020;46(2):263–271. DOI: 10.1016/j.ejso.2019.09.189.
- Ni J. S., Janz T. A., Nguyen S. A., Lentsch E. J. Predictors of occult lymph node metastasis in cutaneous head and neck melanoma. *World Journal of Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery*. 2019;5(4):200–206. DOI: 10.1016/j.wjorl.2019.02.003.
- Tortorella L., Casarin J., Multini F., Cappuccio S., McGree M. E., Weaver A. L., Langstraat C. L., Keeney G. L., Kumar A., Melis G. B., Angioni S., Scambia G., Mariani A., Glaser G. E. Sentinel lymph node biopsy with cervical injection of indocyanine green in apparent early-stage endometrial cancer: predictors of unsuccessful mapping. *Gynecologic Oncology*. 2019;155(1):34–38. DOI: 10.1016/j.ygyno.2019.08.008.
- Cabañas R. M. An approach for the treatment of penile cancer. *Cancer*. 1977;39:456–466.
- Krzhivitskii P. I., Novikov S. N., Kanaev S. V., Krivorotko P. V., Popova N. S., Chernaya A. V., Klitcenko O. A. The use of single-photon emission computed tomography-computed tomography in detecting multiple metastatic lymph nodes in patients with breast cancer. *Nuclear Medicine Communications*. 2019;40(2):169–174. DOI: 10.1097/MNM.00000000000000954.
- Persico M. G., Marenco M., De Matteis G., Manfrinato G., Cavagnagh G., Sgarella A., Aprile C., Lodola L.  $^{99m}\text{Tc}$ - $^{68}\text{Ga}$ -ICG-Labelled Macroaggregates and Nanocolloids of Human Serum Albumin: Synthesis Procedures of a Trimodal Imaging Agent Using Commercial Kits. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2020;2020:1–11. DOI: 10.1155/2020/3629705.
- Чернов В. И., Афанасьев С. Г., Синилкин А. А., Тицкая А. А., Августинович А. В. Радионуклидные методы исследования в выявлении «Сторожевых» лимфатических узлов. *Сибирский онкологический журнал*. 2008;28(4):5–10.
- Чернов В. И., Синилкин И. Г., Зельчан Р. В., Тицкая А. А., Кодина Г. Е., Малышева А. О., Клементьева О. Е., Таратоненкова Н. А., Лишманов Ю. Б. Экспериментальное изучение возможности использования  $^{99m}\text{Tc}$ -нанотеха для визуализации лимфатических узлов. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2011;56(1):36–42.
- Sadkin V., Skuridin V., Nesterov E., Stasyuk E., Rogov A., Varlamova N., Zelchan R.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled nanocolloid drugs: development methods. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14013. DOI: 10.1038/s41598-020-70991-2.
- Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Варламова В. Н., Рогов А. С., Садкин В. Л., Нестеров Е. А. Получение нового наноколлоидного радиофармпрепарата на основе оксида алюминия. *Известия Томского политехнического университета*. 2013;323(3):33–37.
- Варламова Н. В., Скуридин В. С., Нестеров Е. А., Ларионова Л. А., Чернов В. И. Исследование кумулятивных свойств радиофармпрепарата «Наноколлоид,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ » на крысах. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2015;13(2):40–44.
- Варламова Н. В., Стасюк Е. С., Тицкая А. А., Синилкин И. Г., Ларионова Л. А., Шерстобоев Е. Ю., Трофимова Е. С., Лигачева А. А., Скуридин В. С. Изучение аллергизирующих свойств радиофармпрепарата «Наноколлоид,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ » в эксперименте. *Современные технологии в медицине*. 2015;4:72–77. DOI: 10.17691/stm2015.7.4.09.
- Варламова Н. В., Скуридин В. С., Нестеров Е. А., Чернов В. И., Тицкая А. А. Исследование острой токсичности нового радиофармацевтического препарата «Наноколлоид,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ » для диагностики в онкологии. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(6):26–29. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-6-26-29.
- Скуридин В. С., Чернов В. И., Варламова Н. В., Нестеров Е. А., Синилкин И. Г., Зельчан Р. В. Исследование функциональной пригодности радиофармпрепарата «Наноколлоид,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ » для сцинтиграфического и интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов. *Диагностическая и интервенционная радиология*. 2015;3:76–80.
- Chernov V., Titskaya A., Sinilkin I., Zelchan R., Varlamova N. Possibility to Use the Radiopharmaceutical Based on the Gamma-Aluminum Oxide Labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  to Identify Sentinel Lymph Nodes in the Experiment. *Advanced Materials Research*. 2015;1084:443–446. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.1084.443.
- Uren R. F., Howman-Giles R. B., Chung D., Thompson J. F. Role of lymphoscintigraphy for selective sentinel lymphadenectomy. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2005;127:15–38. DOI: 10.1007/0-387-23604-x\_2.
- Ban E. J., Lee J. S., Koo J. S., Park S., Kim S. I., Park B. W. How many sentinel lymph nodes are enough for accurate axillary staging in T1-2 breast cancer? *Journal of Breast Cancer*. 2011;14:296–300. DOI: 10.4048/jbc.2011.14.4.296.
- Schuman S., Walker G., Avisar E. Processing sentinel nodes in breast cancer: when and how many? *The Archives of Surgery*. 2011;146:389–393. DOI: 10.1001/archsurg.2011.29.
- Uren R. F., Howman-Giles R., Chung D. K. V., Spillane A. J., Noushi F., Gillett D., Gluch L., Mak C., West R., Briody J., Carmalt H. SPECT/CT scans allow precise anatomical location of sentinel lymph nodes in breast cancer and redefine lymphatic drainage from the breast to the axilla. *Breast*. 2012;21:480–486. DOI: 10.1016/j.breast.2011.11.007.
- Brenot-Rossi I., Houvenaeghel G., Jacquemier J., Bardou V. J., Martino M., Hassan-Sebbag N., Pasquier J. Nonvisualization of axillary sentinel node during lymphoscintigraphy: is there a pathologic significance in breast cancer? *Journal of Nuclear Medicine*. 2003;44:1232–1237.
- Cheng G., Kurita G., Kurita S., Torigian D. A., Alavi A. Current status of sentinel lymph-node biopsy in patients with breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011;38:562–575. DOI: 10.1007/s00259-010-1577-z.
- Lawson G., Matar N., Nolleaux M. C., Jamart J., Krug B., Delos M., Remacle M., Borgh T. V. Reliability of sentinel node technique in

- the treatment of N0 supraglottic laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2010;120:2213–2217. DOI: 10.1002/lary.21131.
23. De Veij Mestdagh P. D., Schreuder W. H., Vogel W. V., Donswijk M. L., van Werkhoven E., van der Wal J. E., Dirven R., Karakulukcu B., Sonke J. J., van den Brekel M. W. M., Marijnen C. A. M., Al-Mamgani A. Mapping of sentinel lymph node drainage using SPECT/CT to tailor elective nodal irradiation in head and neck cancer patients (SUSPECT-2): a single-center prospective trial. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1110. DOI: 10.1186/s12885-019-6331-8.
24. Yoshimoto S., Hasegawa Y., Matsuzaka T., Shiotani A., Takahashi K., Kohno N., Yoshida T., Kitano H. Sentinel node biopsy for oral and laryngopharyngeal squamous cell carcinoma: a retrospective study of 177 patients in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2012;39(1):65–70. DOI: 10.1016/j.anl.2011.03.002.
- ## REFERENCES
- Boada A., Tejera-Vaquerizo A., Ribero S., Puig S., Moreno-Ramírez D., Quaglino P., Osella-Abate S., Cassoni P., Malvehy J., Carrera C., Pigem R., Barreiro-Capurro A., Requena C., Traves V., Manrique-Silva E., Fernández-Orland A., Ferrandiz L., García-Senosiain O., Fernández-Figueras M. T., Ferrández C., Nagore E. SENTIMEL study group. Factors associated with sentinel lymph node status and prognostic role of completion lymph node dissection for thick melanoma. *European Journal of Surgical Oncology*. 2020;46(2):263–271. DOI: 10.1016/j.ejso.2019.09.189.
  - Ni J. S., Janz T. A., Nguyen S. A., Lentsch E. J. Predictors of occult lymph node metastasis in cutaneous head and neck melanoma. *World Journal of Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery*. 2019;5(4):200–206. DOI: 10.1016/j.wjorl.2019.02.003.
  - Tortorella L., Casarin J., Multini F., Cappuccio S., McGree M. E., Weaver A. L., Langstraat C. L., Keeney G. L., Kumar A., Melis G. B., Angioni S., Scambia G., Mariani A., Glaser G. E. Sentinel lymph node biopsy with cervical injection of indocyanine green in apparent early-stage endometrial cancer: predictors of unsuccessful mapping. *Gynecologic Oncology*. 2019;155(1):34–38. DOI: 10.1016/j.ygyno.2019.08.008.
  - Cabañas R. M. An approach for the treatment of penile cancer. *Cancer*. 1977;39:456–466.
  - Krzhivitskii P. I., Novikov S. N., Kanaev S. V., Krivorotko P. V., Popova N. S., Chernaya A. V., Klitcenko O. A. The use of single-photon emission computed tomography-computed tomography in detecting multiple metastatic lymph nodes in patients with breast cancer. *Nuclear Medicine Communications*. 2019;40(2):169–174. DOI: 10.1097/MNM.00000000000000954.
  - Persico M. G., Marenco M., De Matteis G., Manfrinato G., Cavagnoli G., Sgarella A., Aprile C., Lodola L.  $^{99m}\text{Tc}$ - $^{68}\text{Ga}$ -ICG-Labelled Macroaggregates and Nanocolloids of Human Serum Albumin: Synthesis Procedures of a Trimodal Imaging Agent Using Commercial Kits. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2020;2020:1–11. DOI: 10.1155/2020/3629705.
  - Chernov V. I., Afanas'ev S. G., Sinilkin A. A., Tickaya A. A., Avgustinovich A. V. Radionuclide research methods in identifying "sentinel" lymph nodes. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*. 2008;28(4):5–10. (In Russ.)
  - Chernov V. I., Sinilkin I. G., Zel'chan R. V., Tickaya A. A., Kodina G. E., Malysheva A. O., Klement'eva O. E., Taratonenkova N. A., Lishmanov Yu. B. Experimental study of the possibility of using  $^{99m}\text{Tc}$ -nanotech for visualization of lymph nodes. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost'*. 2011;56(1):36–42. (In Russ.)
  - Sadkin V., Skuridin V., Nesterov E., Stasyuk E., Rogov A., Varlamova N., Zelchan R.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled nanocolloid drugs: development methods. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14013. DOI: 10.1038/s41598-020-70991-2.
  - Skuridin V. S., Stasyuk E. S., Varlamova V. N., Rogov A. S., Sadkin V. L., Nesterov E. A. Obtaining a new nanocolloidal radiopharmaceutical based on aluminum oxide. *Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta*. 2013;323(3):33–37. (In Russ.)
  - Varlamova N. V., Skuridin V. S., Nesterov E. A., Larionova L. A., Chernov V. I. Study of the cumulative properties of the radiopharmaceutical "Nanocolloid,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ " on rats. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya medicina*. 2015;13(2):40–44. (In Russ.)
  - Varlamova N. V., Stasyuk E. S., Tickaya A. A., Sinilkin I. G., Larionova L. A., Sherstoboev E. Yu., Trofimova E. S., Ligacheva A. A., Skuridin V. S. Study of the allergenic properties of the radiopharmaceutical "Nanocolloid,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ " in the experiment. *Sovremennoye tekhnologii v medicine*. 2015;4:72–77. (In Russ.) DOI: 10.17691/stm2015.7.4.09.
  - Varlamova N. V., Skuridin V. S., Nesterov E. A., Chernov V. I., Tickaya A. A. Acute toxicity study of a new radiopharmaceutical "Nanocolloid,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ " for diagnostics in oncology. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015;78(6):26–29. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-6-26-29.
  - Skuridin V. S., Chernov V. I., Varlamova N. V., Nesterov E. A., Sinilkin I. G., Zel'chan R. V. Study of the functional suitability of the "Nanocolloid,  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ " radiopharmaceutical for scintigraphic and intraoperative detection of sentinel lymph nodes. *Diagnosticheskaya i intervencionnaya radiologiya*. 2015;3:76–80. (In Russ.)
  - Chernov V., Titskaya A., Sinilkin I., Zelchan R., Varlamova N. Possibility to Use the Radiopharmaceutical Based on the Gamma-Aluminum Oxide Labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  to Identify Sentinel Lymph Nodes in the Experiment. *Advanced Materials Research*. 2015;1084:443–446. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.1084.443.
  - Uren R. F., Howman-Giles R. B., Chung D., Thompson J. F. Role of lymphoscintigraphy for selective sentinel lymphadenectomy. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2005;127:15–38. DOI: 10.1007/0-387-23604-x\_2.
  - Ban E. J., Lee J. S., Koo J. S., Park S., Kim S. I., Park B. W. How many sentinel lymph nodes are enough for accurate axillary staging in T1-2 breast cancer? *Journal of Breast Cancer*. 2011;14:296–300. DOI: 10.4048/jbc.2011.14.4.296.
  - Schuman S., Walker G., Avisar E. Processing sentinel nodes in breast cancer: when and how many? *The Archives of Surgery*. 2011;146:389–393. DOI: 10.1001/archsurg.2011.29.
  - Uren R. F., Howman-Giles R., Chung D. K. V., Spillane A. J., Noushi F., Gillett D., Gluch L., Mak C., West R., Briody J., Carmalt H. SPECT/CT scans allow precise anatomical location of sentinel lymph nodes in breast cancer and redefine lymphatic drainage from the breast to the axilla. *Breast*. 2012;21:480–486. DOI: 10.1016/j.breast.2011.11.007.
  - Brenot-Rossi I., Houvenaeghel G., Jacquemier J., Bardou V. J., Martino M., Hassan-Sebbag N., Pasquier J. Nonvisualization of axillary sentinel node during lymphoscintigraphy: is there a pathologic significance in breast cancer? *Journal of Nuclear Medicine*. 2003;44:1232–1237.
  - Cheng G., Kurita G., Kurita S., Torigian D. A., Alavi A. Current status of sentinel lymph-node biopsy in patients with breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011;38:562–575. DOI: 10.1007/s00259-010-1577-z.
  - Lawson G., Matar N., Nolleaux M. C., Jamart J., Krug B., Delos M., Remacle M., Borgh T. V. Reliability of sentinel node technique in the treatment of N0 supraglottic laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2010;120:2213–2217. DOI: 10.1002/lary.21131.
  - De Veij Mestdagh P. D., Schreuder W. H., Vogel W. V., Donswijk M. L., van Werkhoven E., van der Wal J. E., Dirven R., Karakulukcu B., Sonke J. J., van den Brekel M. W. M., Marijnen C. A. M., Al-Mamgani A. Mapping of sentinel lymph node drainage using SPECT/CT to tailor elective nodal irradiation in head and neck cancer patients (SUSPECT-2): a single-center prospective trial. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1110. DOI: 10.1186/s12885-019-6331-8.
  - Yoshimoto S., Hasegawa Y., Matsuzaka T., Shiotani A., Takahashi K., Kohno N., Yoshida T., Kitano H. Sentinel node biopsy for oral and laryngopharyngeal squamous cell carcinoma: a retrospective study of 177 patients in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2012;39(1):65–70. DOI: 10.1016/j.anl.2011.03.002.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-253-260>  
УДК 616.24-006.6-08-036.8:615.28:575.113



Оригинальная статья / Research article

## Прогностическая и предиктивная значимость экспрессии мРНК генов ABC-транспортеров у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

М. М. Цыганов<sup>1,3</sup>, М. К. Ибрагимова<sup>1,2,3</sup>, Е. О. Родионов<sup>1</sup>, А. А. Фролова<sup>1</sup>,  
С. В. Миллер<sup>1</sup>, О. В. Черемисина<sup>1</sup>, С. А. Тузиков<sup>1</sup>, Н. В. Литвяков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ онкологии, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ РАН), 634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (ТГУ), 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ Контактное лицо: Ибрагимова Марина Константиновна. E-mail: imk1805@yandex.ru

ORCID: М. М. Цыганов – <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>; М. К. Ибрагимова – <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>;

Е. О. Родионов – <https://orcid.org/0000-0003-4980-8986>; А. А. Фролова – <https://orcid.org/0000-0003-3297-1680>; С. В. Миллер – <https://orcid.org/0000-0002-5365-9840>;  
О. В. Черемисина – <https://orcid.org/0000-0001-7234-4708>; С. А. Тузиков – <https://orcid.org/0000-0002-0884-1838>; Н. В. Литвяков – <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 25.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

### Резюме

**Введение.** На сегодняшний день одной из причин неэффективности проводимой химиотерапии при разных злокачественных новообразованиях, в том числе и при раке легкого, считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у опухолевых клеток, которая обусловлена экспрессией генов ABC-транспортеров.

**Цель.** Целью работы явилась оценка экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе химиотерапии и анализ связи с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания.

**Материалы и методы.** В работе был использован биопсийный и операционный материал от 91 больного немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) IIB–IIIA стадии. В схему лечения было включено 2 курса неoadъюvantной химиотерапии (НХТ), операция и 3 курса адъюvantной химиотерапии (АХТ) «платиновыми дуплетами». Из образцов выделяли РНК с последующей постановкой количественной ПЦР для оценки экспрессии генов ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCG1, ABCG2.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что уровень экспрессии исследуемых генов не связан с эффектом НХТ у больных раком легкого, кроме гена ABCC5, у которого показана связь на уровне выраженной тенденции ( $p = 0,07$ ). Так же было показано, что в группе больных с объективным ответом на химиотерапию частота снижения экспрессии генов ABCC1 ( $p = 0,01$ ) и ABCC5 ( $p = 0,004$ ) статистически значимо выше по сравнению с группой пациентов со стабилизацией. Далее методом Каплана – Майера было установлено, что снижение экспрессии связано с высокими показателями безметастатической выживаемостью (БМВ). Наибольшие показатели 5-летней БМВ (более 85 %) отмечаются у пациентов со снижением экспрессии генов ABCB1 и ABCG2, log-rank test  $p = 0,0007$  и  $p = 0,002$  соответственно.

**Заключение.** Таким образом, показано, что изменение экспрессии генов ABC-транспортеров связано с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания. Полученные данные могут быть использованы в качестве основы для обнаружения потенциальных мишенией для лекарственных средств.

**Ключевые слова:** экспрессия генов, немелкоклеточный рак легкого, ABC-транспортеры, прогноз заболевания, эффект химиотерапии

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

**Вклад авторов.** М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова, А. А. Фролова написали текст рукописи. Е. О. Родионов, С. В. Миллер провели анализ полученных данных. О. В. Черемисина осуществила получение данных для анализа. С. А. Тузиков, Н. В. Литвяков разработали дизайн исследования.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00023 «Исследование роли вируса папилломы человека (ВПЧ) в канцерогенезе немелкоклеточного рака легкого».

**Соответствие принципам этики.** Проведенная работа соответствует 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. От лица, участвующего в исследовании, получено информированное согласие.

**Для цитирования:** Цыганов М. М., Ибрагимова М. К., Родионов Е. О., Фролова А. А., Миллер С. В., Черемисина О. В., Тузиков С. А., Литвяков Н. В. Прогностическая и предиктивная значимость экспрессии мРНК генов ABC-транспортеров у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):253–260. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-253-260>

## Prognostic and Predictive Significance of mRNA Expression of ABC-transporter Genes in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

Matvey M. Tsyanov<sup>1,3</sup>, Marina K. Ibragimova<sup>1,2,3</sup>, Evgeny O. Rodionov<sup>1</sup>, Anastasia A. Frolova<sup>1</sup>,  
Sergey V. Miller<sup>1</sup>, Olga V. Cheremisina<sup>1</sup>, Sergey A. Tuzikov<sup>1</sup>, Nikolay V. Litvyakov<sup>1</sup>

© Цыганов М. М., Ибрагимова М. К., Родионов Е. О., Фролова А. А., Миллер С. В., Черемисина О. В., Тузиков С. А., Литвяков Н. В., 2022  
© Tsyanov M. M., Ibragimova M. K., Rodionov E. O., Frolova A. A., Miller S. V., Cheremisina O. V., Tuzikov S. A., Litvyakov N. V., 2022

<sup>1</sup> Research Institute of Oncology, Federal State Budgetary Scientific Institution «Tomsk National Research Center for Medicine by the Russian Academy of Sciences», 5, Kooperativny lane, Tomsk, 634009, Russia

<sup>2</sup> The National Research Tomsk State University, TSU, 36, Lenina av., Tomsk, 634050, Russia

<sup>3</sup> Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moscow tract, Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Marina K. Ibragimova. E-mail: imk1805@yandex.ru

ORCID: Matvey M. Tsyanov – <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>; Marina K. Ibragimova – <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>;

Evgeny O. Rodionov – <https://orcid.org/0000-0003-4980-8986>; Anastasia A. Frolova – <https://orcid.org/0000-0003-3297-1680>;

Sergey V. Miller – <https://orcid.org/0000-0002-5365-9840>; Olga V. Cheremisina – <https://orcid.org/0000-0001-7234-4708>; Sergey A. Tuzikov – <https://orcid.org/0000-0002-0884-1838>;

Nikolay V. Litvyakov – <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>.

Received: 06.09.2022

Revised: 25.10.2022

Published: 25.11.2022

## Abstract

**Introduction.** To date, one of the reasons for the ineffectiveness of chemotherapy in various malignant neoplasms, including lung cancer, is the formation of the multidrug resistance (MDR) phenotype in tumor cells, which is caused by the expression of ABC transporter genes.

**Aim.** The aim of this work was to assess the expression of ABC-transporter genes during chemotherapy and to analyze the relationship with the effectiveness of chemotherapy and prognosis of the disease.

**Materials and methods.** We used biopsy and surgical material from 91 patients with stage IIIB–IIIA non-small cell lung cancer (NSCLC). The treatment regimen included: 2 courses of neoadjuvant chemotherapy (NAC), surgery and 3 courses of adjuvant chemotherapy (ACT) with platinum doublets. RNA was isolated from the samples, followed by quantitative PCR to assess the expression of genes *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*.

**Results and discussion.** It was shown that the level of expression of the studied genes was not associated with the effect of NAC in patients with lung cancer, except for the *ABCC5* gene, which showed a relationship at the level of a pronounced trend ( $p = 0.07$ ). It was also shown that in the group of patients with an objective response to chemotherapy, the frequency of decreased expression of the *ABCC1* ( $p = 0.01$ ) and *ABCC5* ( $p = 0.004$ ) genes was statistically significantly higher than in the group of patients with stabilization. Further, using the Kaplan – Meier method, it was found that a decrease in expression is associated with high rates of metastatic-free survival (MFS). The highest rates of 5-year MFS (more than 85 %) are observed in patients with a decrease in the expression of the *ABCB1* and *ABCG2* genes, log-rank test  $p = 0.0007$  and  $p = 0.002$ , respectively.

**Conclusion.** Thus, it has been shown that changes in the expression of ABC transporter genes are associated with the effectiveness of chemotherapy and the prognosis of the disease. The data obtained can be used as a basis for the detection of potential drug targets.

**Keywords:** gene expression, non-small cell lung cancer, ABC transporters, disease prognosis, effect of chemotherapy

**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.** Matvey M. Tsyanov, Marina K. Ibragimova, Anastasia A. Frolova wrote the text of the manuscript. Evgeny O. Rodionov, Sergey V. Miller analyzed of the data obtained. Olga V. Cheremisina obtained data for analysis. Sergey A. Tuzikov, Nikolay V. Litvyakov designed the study.

**Funding.** This work was supported by grant number 20-015-00023 RFBR «Study of the role of human papillomavirus (HPV) in the carcinogenesis of non-small cell lung cancer».

**Compliance with the principles of ethics.** The work performed complies with the ethical standards developed in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association "Ethical principles for conducting scientific medical research involving humans" as amended in 2000 and the "Rules of Clinical Practice in the Russian Federation" approved by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 19.06.2003 No. 266. Informed consent was obtained from the person participating in the study.

**For citation:** Tsyanov M. M., Ibragimova M. K., Rodionov E. O., Frolova A. A., Miller S. V., Cheremisina O. V., Tuzikov S. A., Litvyakov N. V. Prognostic and predictive significance of mRNA expression of ABC-transporter genes in patients with non-small cell lung cancer. *Drug development & registration*. 2022;11(4):253–260. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-253-260>

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день применяемая системная химиотерапия с включением как препаратов платины, так и иных цитотоксических агентов, таких как винорелбин, гемцитабин, таксаны и т. д., является стандартом лечения больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [1]. Системная химиотерапия может быть использована в неоадьювантном и/или адьювантном режимах. Однако по поводу эффективности химиотерапии при раке легкого существует мнение об относительной химиорезистентности рака легкого по сравнению с другими локализациями.

В исследованиях было установлено, что эффективность применяемой неоадьювантной химиотерапии (НХТ) у больных НМРЛ сильно варьирует [2, 3]. В работе K. Pisters et al. [4] авторы сообщили, что лишь 12 % (9/73) больных, получавших НХТ, достигли полного морфологического ответа, J. A. Roth et al. [5] показал полное отсутствие эффективности НХТ на 28 пациентах, в исследовании R. Rosell et al. [6] всего у 3 % (1/30) больных НМРЛ наблюдался положительный ответ на лечение. В комплексной работе Adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) установлено, что применение химиотерапии увеличивало медиану выживаемости пациентов (65,7 месяцев; OR 0,80;

95 % CI 0,66–0,96,  $p = 0,02$ ) [7]. Но сожалением приходится констатировать, что комбинация стандартных схем химиотерапии практически в полной мере исчерпали свои возможности в плане повышения эффективности, а с учетом того, что данное злокачественное новообразование является весьма гетерогенным в отношении чувствительности к химиотерапии, эффективность применяемого лечения остается сравнительно невысокой [8]. К одной из важных причин неэффективности проводимой химиотерапии при разных злокачественных новообразованиях, в том числе и при раке легкого (РЛ), относят формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у опухолевых клеток как до лечения, так и в процессе химиотерапии [9]. Как правило, эффективность использования химиотерапии для лечения РЛ ограничено индивидуальной чувствительностью опухоли, определяемой соответствием наличия мишени действия химиопрепаратов, назначенной схемой химиотерапии и развитием неспецифической резистентности опухолевых клеток [10]. Хорошо известно многие противоопухолевые препараты интенсивно метаболизируются в организме посредством различных механизмов, в частности процесса биотрансформации и транспортирования [11], который обусловлен экспрессией генов семейства энергозависимых ABC-транспортеров (ATP-binding cassette transporter), играющих первоочередную роль в развитии МЛУ опухолевых клеток [12]. На модели рака молочной железы (РМЖ) нами было показано, что изменение экспрессии в процессе неoadъювантной химиотерапии (НХТ) некоторых генов ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) связано с ответом на проводимую химиотерапию у больных РМЖ [9], при этом снижение экспрессии обуславливает формирование объективного ответа на лечение (полная и частичная регрессия), тогда как повышение – отсутствие ответа (прогрессирование и стабилизация опухоли). Таким образом, **целью работы** явилась оценка экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе химиотерапии у больных НМРЛ и анализ связи с эффективностью химиотерапии и прогнозом заболевания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 91 больной НМРЛ IIIB–IIIA стадий с морфологически верифицированным диагнозом, которые находились на лечении в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Вся научно-исследовательская работа была проведена в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 2013 г.) [13] и с разрешения этического комитета института. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на исследование. В схему лечения больных входило: 2 курса нео-

адьювантной химиотерапии по схеме: «Винорелбин» 25 мг/м<sup>2</sup> (1-й и 8-й дни)/«Карбоплатин» AUC 6 (во 2-й день) с интервалом 3 недели и последующей оценкой эффекта. Эффективность НХТ была оценена с помощью шкалы RECIST. После НХТ пациентам проводилась операция в объеме пневмонэктомии или лобэктомии. После проведено 3 курса адьювантной химиотерапии (АХТ) по схемам: «Винорелбин» 25 мг/м<sup>2</sup> (1-й и 8-й дни)/«Карбоплатин» AUC 6 (во 2-й день); «Доксорубицин» 50 мг/м<sup>2</sup>/«Карбоплатин» AUC 6 (во 2-й день); «Гемцитабин» 1250 мг/м<sup>2</sup> (1-й, 8-й дни)/«Карбоплатин» AUC 6 (во 2-й день); «Карбоплатин» AUC 6 (во 2-й день)/«Паклитаксел» 175 мг/м<sup>2</sup>. Интервал между курсами химиотерапии составил 3 недели. Основные клинико-патологические параметры, включенных в исследование пациентов, представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Основные клинико-морфологические параметры обследованных пациентов**

**Table 1. The main clinical and morphological parameters of the examined patients**

Клинико-морфологический параметр Clinical and morphological parameter	Количество больных, абс. ч. (%), (n = 91) Number of patients, abs. hours (%), (n = 91)
Возраст Age	≤50 лет ≤50 years
	>50 лет >50 years
Пол Gender	Мужской Male
	Женский Female
Размер опухоли Tumor size	T <sub>1</sub>
	T <sub>2</sub>
	T <sub>3</sub>
	T <sub>4</sub>
Лимфогенное метастазирование Lymphogenic metastasis	N <sub>0</sub>
	N <sub>1</sub>
	N <sub>2</sub>
	N <sub>3</sub>
Клинико-анатомическая форма Clinical and anatomical form	Центральный Central
	Периферический Peripheral
Гистологический тип Histological type	Плоскоклеточный Squamous
	Аденокарцинома Adenocarcinoma
Эффект НХТ NAC effect	Полная регрессия Complete regression
	Частичная регрессия Partial regression
	Стабилизация Stabilization

<b>Клинико-морфологический параметр</b> <b>Clinical and morphological parameter</b>		<b>Количество больных, abs. ч. (%), (n = 91)</b> <b>Number of patients, abs. hours (%), (n = 91)</b>
Характер операции The type of the operation	Пневмонэктомия Pneumonectomy	48 (53,9)
	Лобэктомия Lobectomy	41 (46,1)
Схема АХТ ACT scheme	«Винорелбин»/ «Карбоплатин» "Vinorelbine"/ "Carboplatin"	65 (73,0)
	«Доксорубицин»/ «Карбоплатин» "Doxorubicin"/ "Carboplatin"	1 (1,1)
	«Гемцитабин»/ «Цисплатин» "Gemcitabine"/ "Cisplatin"	8 (9,0)
	«Гемцитабин»/ «Карбоплатин» "Gemcitabine"/ "Carboplatin"	6 (6,7)
	«Иринотекан»/ «Цисплатин» "Irinotecan"/ "Cisplatin"	2 (2,2)
	«Паклитаксел»/ «Цисплатин» "Paclitaxel"/ "Cisplatin"	1 (1,1)
	«Паклитаксел»/ «Карбоплатин» "Paclitaxel"/ "Carboplatin"	6 (6,7)
	Есть Yes	22 (24,7)
Гематогенное метастазирование Hematogenous metastasis	Нет No	67 (75,3)

Материалом для исследования служили биопсийные (~5–10 мм<sup>3</sup>) и операционные образцы нормальной и опухолевой ткани (~30–60 мм<sup>3</sup>), которые помещали в раствор RNAlater (Ambion, США). После 24-часовой инкубации при +4 °C образцы биоматериала сохраняли при температуре –80 °C.

### **Выделение РНК**

РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация РНК составила от 50 до 200 нг/мкл. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, США). RIN составил 6,5–9,0.

### **Количественная ПЦР**

Уровень экспрессии исследуемых генов ABC-транспортеров: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCG1, ABCG2 оценивали при помощи количественной об-

ратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan® на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралия). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ RT (Thermo Fisher Scientific, США) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. Оригинальные праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccore>). Уровень экспрессии генов измерялся в условных единицах с помощью метода Pfaffl [14].

### **Статистические методы**

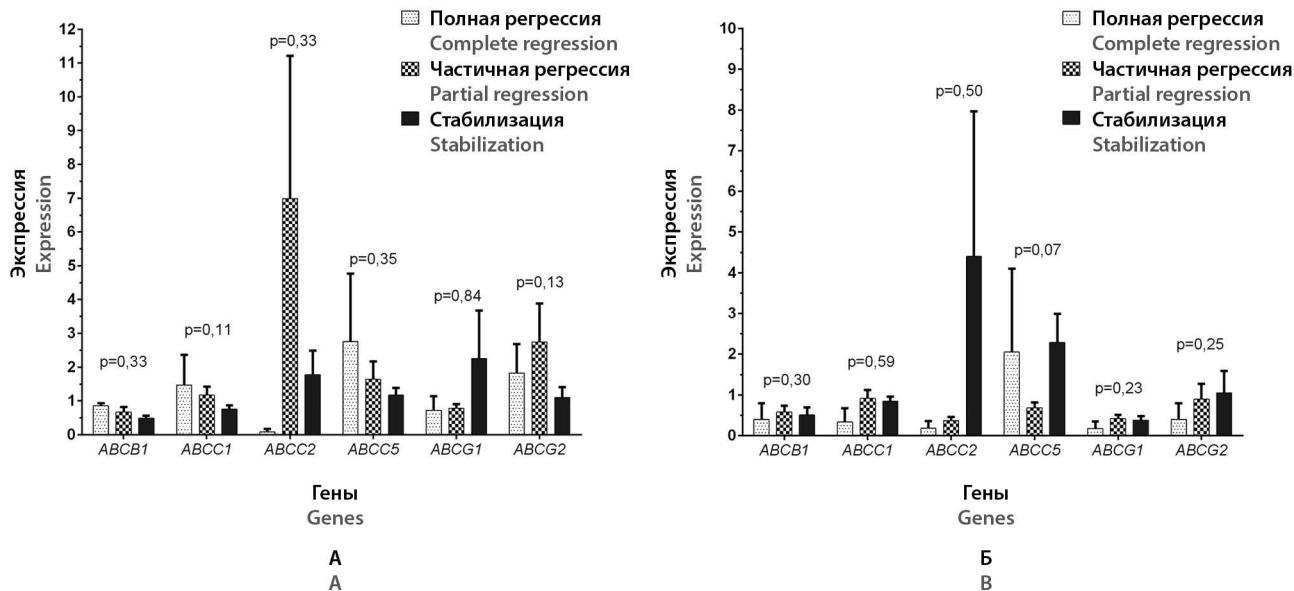
Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона – Манна – Уитни. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для анализа общей и безметастатической выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана – Майера. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью log-rank теста. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера или по критерию хи-квадрат.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Установлено, что уровень экспрессии исследуемых генов (начальный и послеоперационный) не связан с эффектом НХТ у больных раком легкого (рисунок 1).

Лишь для гена ABCC5 установлена связь на уровне выраженной тенденции ( $p = 0,07$ ) с эффектом НХТ. Уровень экспрессии данного гена после лечения выше у пациентов со стабилизацией. Анализ связи экспрессии с показателями безметастатической выживаемости также показал отсутствие значимых различий у пациентов с гипер- и гипоэкспрессией исследуемых генов как до, так и после НХТ. Предыдущие наши исследования на раке молочной железы показали, что изменение экспрессии в процессе неоадъювантной химиотерапии (НХТ) связаны с ответом на проводимую химиотерапию, то есть не сам уровень экспрессии, а именно его изменение: снижение или повышение экспрессии. На основании этого мы исследовали частоту повышения и снижения экспрессии генов ABC-транспортеров у больных НМРЛ при разных ответах на неоадъювантную химиотерапию (таблица 2).

В группе больных с частичной и полной регрессией частота снижения экспрессии генов ABCC1 и ABCC5 статистически значимо выше по сравнению с группой пациентов со стабилизацией. Снижение экспрессии



**Рисунок 1.** Связь начального (А) и послеоперационного (Б) уровня экспрессии генов ABC-транспортеров с эффектом неоадъювантной химиотерапии

**Figure 1.** Relationship between the initial (A) and postoperative (B) levels of ABC-transporter gene expression with the effect of neoadjuvant chemotherapy

**Таблица 2.** Изменение экспрессии генов ABC-транспортеров у больных НМРЛ в зависимости от эффекта неоадъювантной химиотерапии

**Table 2.** Changes in the expression of ABC-transporter genes in patients with NSCLC, depending on the effect of neoadjuvant chemotherapy

Гены Genes	NAC-эффект NAC effect						р-значение p-value	
	Полная регрессия Complete regression		Частичная регрессия Partial regression		Стабилизация Stabilization			
	Частота изменения экспрессии генов ABC-транспортеров [абс. части (%)] The frequency of changes in the expression of ABC-transporter genes [abs. parts (%)]							
	Повышение Increase	Снижение Decrease	Повышение Increase	Снижение Decrease	Повышение Increase	Снижение Decrease		
ABCB1	0 (0,0)	2 (100,0)	10 (34,5)	19 (65,5)	31 (53,4)	27 (46,6)	0,10	
<b>ABCC1</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>2 (100,0)</b>	<b>10 (34,5)</b>	<b>19 (65,5)</b>	<b>36 (62,1)</b>	<b>22 (37,9)</b>	<b>0,01</b>	
ABCC2	1 (50,0)	1 (50,0)	10 (34,5)	19 (65,5)	32 (55,2)	26 (44,8)	0,19	
<b>ABCC5</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>2 (100,0)</b>	<b>10 (34,5)</b>	<b>19 (65,5)</b>	<b>39 (67,2)</b>	<b>19 (32,8)</b>	<b>0,004</b>	
ABCG1	0 (0,0)	2 (100,0)	8 (27,6)	21 (72,4)	20 (34,5)	38 (65,5)	0,50	
ABCG2	0 (0,0)	2 (100,0)	11 (37,9)	18 (62,1)	28 (48,3)	30 (51,7)	0,29	

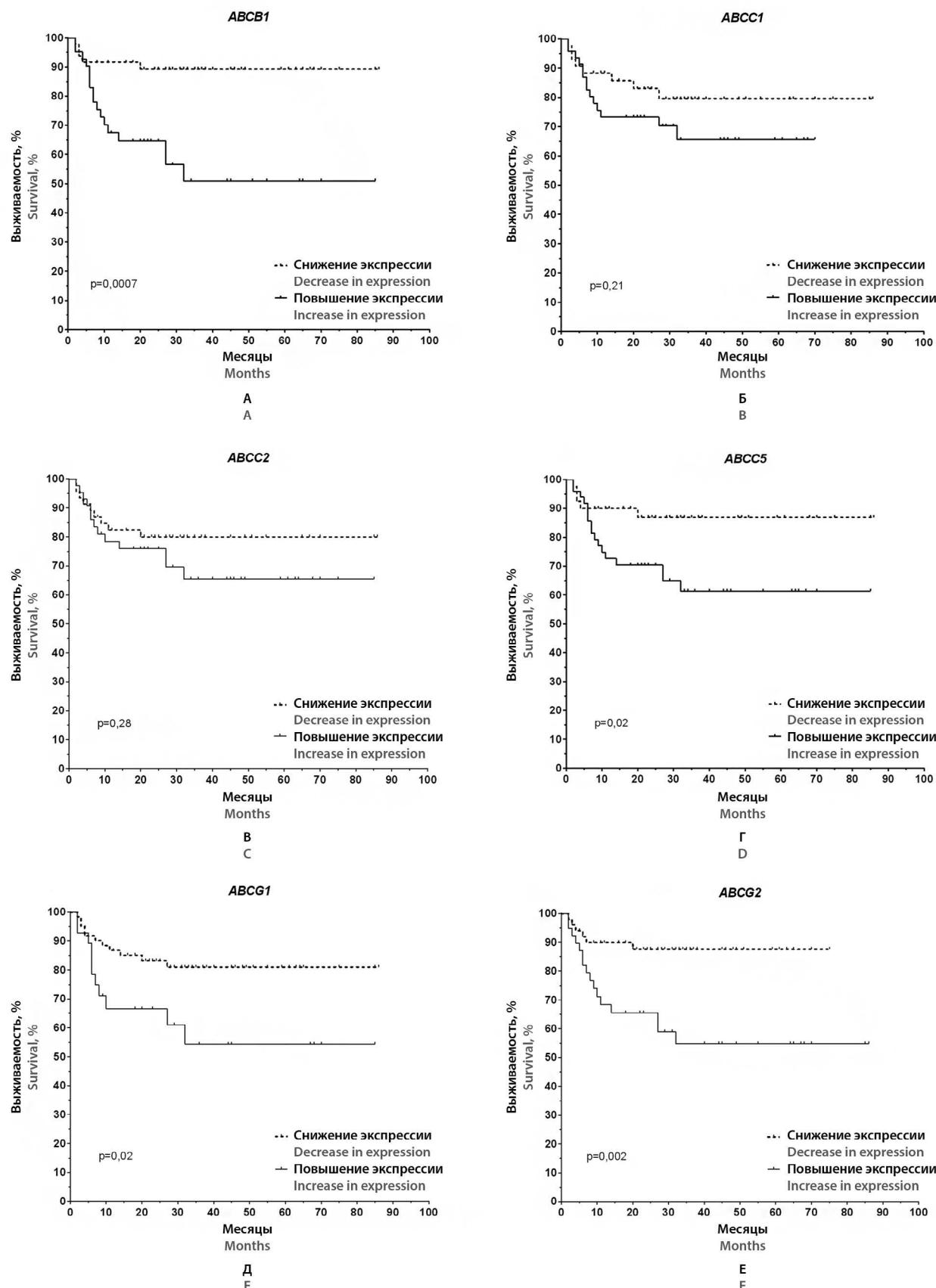
**Примечание.** Жирным шрифтом обозначены статистически значимые различия.

**Note.** Bold indicates statistically significant differences.

рессии данных генов наблюдается у 65,5 % пациентов (19/29 случаев) с объективным ответом на лечение, против 37,9 и 32,8 % пациентов в группе со стабилизацией, соответственно для генов ABCC1 ( $p = 0,01$ ) и ABCC5 ( $p = 0,004$ ). Далее была оценена связь безмезстастической выживаемости с изменением экспрессии ABC-транспортеров (рисунок 2).

Установлено, что снижение экспрессии связано с более высокими показателями БМВ. Наибольшие показатели 5-летней БМВ наблюдаются у пациентов со снижением экспрессии генов ABCB1 и ABCG2 (ри-

сунок 2, А и Е). Данный показатель составляет 90 % против 51 % в группе с повышением экспрессии ABCB1 (log-rank test  $p = 0,0007$ ) и 88 % против 55 % в группе с повышением экспрессии ABCG2 (log-rank test  $p = 0,002$ ). Для генов ABCC1 и ABCC2 статистически значимых различий в выживаемости показано не было (log-rank test  $p = 0,21$  и  $p = 0,28$  соответственно) (рисунок 1, Б и В). Снижение экспрессии ABCC5 и ABCG1 также обуславливает высокие показатели выживаемости (87 % против 62 %, log-rank test  $p = 0,02$  для ABCC5 и 81 % против 55 %, log-rank test  $p = 0,02$  для ABCG1).



**Рисунок 2. Показатели безметастатической выживаемости больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от изменения экспрессии генов ABC-транспортеров: ABCB1 (А), ABCC1 (Б), ABCC2 (В), ABCC5 (Г), ABCG1 (Д), ABCG2 (Е)**

**Figure 2. Metastatic-free survival rates of patients with non-small cell lung cancer depending on changes in the expression of ABC-transporters: ABCB1 (A), ABCC1 (B), ABCC2 (C), ABCC5 (D), ABCG1 (E), ABCG2 (E)**

На сегодняшний день химиотерапия по-прежнему является основным методом лечения пациентов с НМРЛ, а множественная лекарственная устойчивость является одним из наиболее важных факторов, препятствующих положительному исходу лечения, и является частой проблемой в назначении схемы лечения [15].

В мировой литературе имеются единичные публикации о связи изменения экспрессии генов ABC в опухоли легкого с прогнозом заболевания. Важно отметить, что большая часть исследований сосредоточена на поиске ассоциаций непосредственно уровня экспрессии с эффектом лечения и выживаемостью пациентов [16]. Исследования экспрессии генов *ABCC1* и *ABCB1* показали связь с плохим ответом на химиотерапию [17]. Высокий уровень данных генов был обнаружен при возникновении рецидивов [18]. Кроме этого, было показано, что экспрессия *ABCC1* является клинически значимой и может быть независимым предиктивным и прогностическим фактором в отношении клинического исхода у пациентов с раком легкого. Пациенты с высоким уровнем *ABCC1* имели значительно меньшие показатели безрецидивной выживаемости [19].

В работе M. Vesel et al. оценили экспрессию генов *ABCB1* и *ABCG2* в двух разных подтипа НМРЛ (аденокарцинома и плоскоклеточный рак) [20]. Было показано, что при лечении цисплатином происходит повышение экспрессии генов *ABCB1* и *ABCG2*, что сопряжено с неблагоприятным прогнозом заболевания. Кроме этого, другими авторами показано, что наибольший вклад в уменьшение показателей выживаемости (как безрецидивной, так и общей) больных НМРЛ вносит ген *ABCG2*. Высокий уровень его экспрессии ассоциирован с более высокой частотой рецидивирования и метастазирования (130 больных) [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было установлено, что изменение экспрессии некоторых генов ABC-транспортеров сопряжено с более высокими показателями безметастатической выживаемости, а также с эффектом неoadьювантной химиотерапии. Стоит отметить, что именно направление изменения экспрессии исследуемых генов химиорезистентности в процессе лечения играет важную роль в формировании адаптивной лекарственной устойчивости и эффективности проводимого лечения. Данные результаты свидетельствуют о перспективе использования данных прогностических методов в назначении персонализированных схем лечения химиотерапии больным НМРЛ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Duma N., Santana-Davila R., Molina J. R. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2019;94(8):1623–1640. DOI: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013.
2. Brandt W. S., Yan W., Zhou J., Tan K. S., Montecalvo J., Park B. J., Adusumilli P. S., Huang J., Bott M. J., Rusch V. W., Molena D., Travis W. D., Kris M. G., Chafft J. E., Jones D. R. Outcomes after neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for cT2-4N0-1 non-small cell lung cancer: a propensity-matched analysis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2019;157(2):743–753. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2018.09.098.
3. Maclean M., Luo X., Wang S., Kernstine K., Gerber D. E., Xie Y. Outcomes of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in stage 2 and 3 non-small cell lung cancer: an analysis of the National Cancer Database. *Oncotarget*. 2018;9(36):24470–24479. DOI: 10.18632/oncotarget.25327.
4. Pisters K., Kris M. G., Gralla R. J., Zaman M. B., Heelan R. T., Martini N. Pathologic complete response in advanced non-small-cell lung cancer following preoperative chemotherapy: implications for the design of future non-small-cell lung cancer combined modality trials. *Journal of Clinical Oncology*. 1993;11(9):1757–1762. DOI: 10.1200/JCO.1993.11.9.1757.
5. Roth J. A., Fossella F., Komaki R., Ryan M. B., Putnam Jr. J., Lee J. S., Dhingra H., De Caro L., Chasen M., McGavran M., Atkinson E. N., Hong W. K. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(9):673–680. DOI: 10.1093/jnci/86.9.673.
6. Rosell R., Gomez-Codina J., Camps C., Maestre J., Padille J., Cantó A., Mate J. L., Li S., Roig J., Olazabal A., Canela M., Ariza A., Skacel Z., Morera-Prat J., Abad A. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(3):153–158. DOI: 10.1056/NEJM199401203300301.
7. Douillard J.-Y., Rosell R., De Lena M., Carpagnano F., Ramlau R., González-Larriba J. L., Grodzki T., Pereira J. R., Le Groumellec A., Lorusso V., Clary C., Torres A. J., Dahabreh J., Souquet P.-J., Astudillo J., Fournel P., Artal-Cortes A., Jassem J., Koubkova L., His P., Riggi M., Hurteloup P. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2006;7(9):719–727. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70804-X.
8. Pirker R., Filipits M. Adjuvant therapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer: current status and perspectives. *Clinical lung cancer*. 2019;20(1):1–6. DOI: 10.1016/j.cllc.2018.09.016.
9. Litviakov N. V., Cherdynseva N. V., Tsyanov M. M., Denisov E. V., Garbukov E. Y., Merzliakova M. K., Volkomorov V. V., Vtorushin S. V., Zavyalova M. V., Slonimskaya E. M., Perelmuter V. M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;71(1):153–163. DOI: 10.1007/s00280-012-1992-x.
10. Slonimskaya E. M., Kazantseva P. V., Litviakov N. V., Tsyanov M. M., Ibragimova M. K., Doroshenko A. V., Vernadsky R. U., Vostrikova M. A., Lushnikova N. A. Experience of personalized appointment of neoadjuvant chemotherapy for patient with breast cancer: a prospective study. *Farmateka*. 2018;7:64–70. (In Russ.)
11. Đanić M., Mikov M. Biotransformation of Xenobiotics in Living Systems—Metabolism of Drugs: Partnership of Liver and Gut Microflora. *Pharmaceutical Biocatalysis*. 2020;1(1):129–166.
12. Vtorushin S., Khristenko K., Zavyalova M., Perelmuter V., Litviakov N., Denisov E., Dulesova A., Cherdynseva N. The phenomenon of multi-drug resistance in the treatment of malignant tumors. *Experimental Oncology*. 2014;36(3):144–156.
13. Schwartz G. F., Hortobagyi G. N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer*. 2004;100(4):2512–2532. DOI: 10.1002/cncr.20298.

14. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research.* 2001;29(9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
15. Robey R. W., Pluchino K. M., Hall M. D., Fojo A. T., Bates S. E., Gottesman M. M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2018;18(7):452–464. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8.
16. Fung S. W., Cheung P. F.-Y., Yip C. W., Ng L. W.-C., Cheung T. T., Chong C. C.-N., Lee C., Bo-San Lai P., Chan A. W.-H., Tsao G. S.-W., Wong C.-H., Chan S. L., Lo K. W., Cheung S. T. The ATP-binding cassette transporter ABCF1 is a hepatic oncofetal protein that promotes chemoresistance, EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma. *Cancer letters.* 2019;457:98–109. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.010.
17. Bruckmueller H., Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology.* 2021;17(4):369–396. DOI: 10.1080/17425255.2021.1876661.
18. Zawadzka I., Jeleń A., Pietrzak J., Żebrowska-Nawrocka M., Michalska K., Szmajda-Krygier D., Mirowski M., Łochowski M., Kozak J., Balcerzak E. The impact of ABCB1 gene polymorphism and its expression on non-small-cell lung cancer development, progression and therapy – preliminary report. *Scientific reports.* 2020;10(1). DOI: 10.1038/s41598-020-63265-4.
19. Yao S., Sucheston L. E., Zhao H., Barlow W. E., Zirpoli G., Liu S., Moore H. C. F., Budd G. T., Hershman D. L., Davis W., Ciupak G. L., Stewart J. A., Isaacs C., Hobday T. J., Salim M., Hortobagyi G. N., Gralow J. R., Livingston R. B., Albain K. S., Hayes D. F., Ambrosone C. B. Germline genetic variants in ABCB1, ABCC1 and ALDH1A1, and risk of hematological and gastrointestinal toxicities in a SWOG Phase III trial S0221 for breast cancer. *The pharmacogenomics journal.* 2014;14(3):241–247. DOI: 10.1038/tpj.2013.32.
20. Vesel M., Rapp J., Feller D., Kiss E., Jaromi L., Meggyes M., Miskei G., Duga B., Smuk G., Laszlo T., Karner I., Pongracz J. E. ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. *Respiratory research.* 2017;18(1). DOI: 10.1186/s12931-017-0537-6.
21. Han J.-Y., Lim H.-S., Yoo Y.-K., Shin E. S., Park Y. H., Lee S. Y., Lee J.-E., Lee D. H., Kim H. T., Lee J. S., Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer.* 2007;110(1):138–147. DOI: 10.1002/cncr.22760.

## ТЕНЦОВА АНТОНИНА ИВАНОВНА



21.11.1922 – 09.02.2014

21 ноября 2022 года исполняется 100 лет со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора **Антонины Ивановны Тенцовой**.

**Антонина Ивановна** прошла длинный и плодотворный профессиональный путь, выбор которого определился в 1940 году, когда она поступила в Московский фармацевтический институт. Закончить его удалось только в 1950 г., поскольку в годы Великой Отечественной войны она работала в эвакогоспитале. С 1965 по 1985 гг. **А. И. Тенцова** – директор Центрального аптечного научно-исследовательского института (в 1976 г. переименован во Всесоюзный НИИ Фармации МЗ СССР). С 1973 по 1989 гг. возглавляла кафедру заводской технологии лекарственных средств Первого Московского ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени медицинского института им. И.М. Сеченова (ныне кафедра фармацевтической технологии Сеченовского Университета). В 1975 г. **А. И. Тенцовой** первой в фармации было присвоено звание член-корреспондента РАМН по отделению медико-биологических наук, по специальности «Биофармация», она стала членом проблемной комиссии «Фармация» РАМН.

**Антонина Ивановна** в течение ряда лет была заместителем председателя Фармакопейного комитета РФ, возглавляла Центральную проблемную учебно-

методическую комиссию по технологии лекарств Минздрава СССР.

Все вехи профессиональной деятельности **А. И. Тенцовой** связаны с научным направлением «Биофармация», одним из основателей которой она являлась в нашей стране. Под руководством **А. И. Тенцовой** в СССР впервые были начаты исследования фармацевтических факторов (вспомогательные вещества, лекарственная форма, технология ее получения и др.); по разработке липосомальных, микрокапсулированных лекарственных форм, твердых дисперсий; изучение фармакокинетики и биодоступности позволили разработать первую в Российской Федерации ОФС на тест «Растворение».

**А. И. Тенцова**, автор многочисленных публикаций и монографий, достойно представляла отечественную науку в нашей стране и за рубежом, за работу в области биофармации она была награждена правительственными и зарубежными наградами.

Сегодня для специалистов в области фармации для врачей основные постулаты биофармации стали очевидными: о влиянии фармацевтических факторов, о необходимости определения биодоступности и биоэквивалентности знают все. Да и какая фармацевтическая разработка может обойтись без теста «Растворение»! Биофармацевтическая доктрина успешно развивается российскими учеными, логично объединяя различные научные направления.

**Антонина Ивановна** была замечательным человеком. Она была с нами до последних дней жизни, интересовалась работой кафедры, нашими успехами и проблемами, поддерживала добрыми словами. Мы, ученики **Антонины Ивановны Тенцовой**, восхищаемся ее прогрессивностью, широтой мышления, профессионализмом, а также ее искренностью, человечностью, добрым сердцем и великодушием. Мы помним и гордимся, что имели высокую честь сотрудничать с корифеем фармацевтической науки на благо Отечества.

Сотрудники кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный университет им. И. М. Сеченова.

# 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:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

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](http://www.ICMJE.org)

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

## ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (\*.doc), поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

**Перечень документов**, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

### 1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

### 2. РУКОПИСЬ

#### РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
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 РУНБ: <http://elibrary.ru>

##### **Образец оформления**

Mental Health Research Institute  
4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

##### **Abstract**

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

##### **Keywords**

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

**Contribution of the authors.** Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

#### ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

#### **Введение**

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

#### **Материалы и методы**

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группированного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств ([grls.rosminzdrav.ru](http://grls.rosminzdrav.ru)). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру 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 Фармацевтика 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 – группированного 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; r – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа  $M \pm m$ , указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

## **Результаты и обсуждение**

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подобные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

## **Заключение**

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

### **Конфликт интересов**

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т. д.).

При отсутствии таких 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 Хельсинской 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/ECC) и Хельсинской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

### **Благодарности**

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

## **ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ**

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по ал-

фавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригиналами 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 автографераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

**Следует избегать** ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

**Недопустимо самоцитирование**, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт [translit.ru](http://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. *Oncology*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

**3. Литература**

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

**References**

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

**4. Литература/References**

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

**5. Литература/References**

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.

**В библиографическом описании** каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

**Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций**

**Монографии**

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

**Образец оформления**

**Для русскоязычных источников**

**Литература**

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

**References**

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

**Для англоязычных источников**

Jenkins P. F. *Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide*. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

**Статья из журнала**

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

**Образец оформления**

**Для русскоязычных источников**

**Литература**

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57.

**References**

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

**Для англоязычных источников**

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L. B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

**Варианты библиографического описания материалов конференций:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

**Варианты библиографического описания патентов:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

**Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>

**DOI**

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

**ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ**

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

**Таблицы**

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ \*. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

**Рисунки**

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате \*tif, \*jpg, \*cdr, \*ai, с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номе-ру рисунка.



## **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 dossier, 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](mailto:info@pharmjournal.ru); [pharmjournalru@gmail.com](mailto:pharmjournalru@gmail.com)*  
или по телефону +7 977 781 86 18



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 ВИНТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЭТ, 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](mailto:info@cpha.ru)



**Печатный журнал**



**Информационный ресурс**

## **Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»**

Это интернет-ресурс и печатный научный журнал международного уровня для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств.

### **Наша аудитория:**

Среди наших читателей специалисты и руководители отделов разработки ЛС, контроля и обеспечения качества, специалисты по ДКИ, КИ, отделов регистрации, сотрудники аналитических лабораторий, технологии, инженеры, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний.

### **Разделы журнала:**

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Фармацевтическая технология.
- ✓ Методы анализа лекарственных средств.
- ✓ Доклинические и клинические исследования.
- ✓ Регуляторные вопросы.

### **Журнал индексируется в ведущих научных базах:**

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЭТ, Base, РГБ, Lens.

**Периодичность выхода номеров журнала 4 раза в год**

**Мы в Telegram**



**По вопросам сотрудничества**  
**info@pharmjournal.ru**