

# РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ

ВАК Scopus®

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION



**Специальный выпуск, посвященный 85-летию юбилею  
ФГБОУ ВО «Пермская государственная  
фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации**



**Special Issue Dedicated to the 85th Anniversary Federal State  
Budgetary Educational Institution of Higher Education  
"Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health  
of the Russian Federation**



# Региональный испытательный центр «ФАРМАТЕСТ»

научно-производственное структурное подразделение ПГФА

## НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ:

1. Анализ лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения.
2. Разработка и/или валидация методик испытаний.
3. Испытание пищевых продуктов и БАД.
4. Проведение аналитической части доклинических и клинических фармакокинетических исследований, в том числе исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов.
5. Проведение биологических исследований с использованием лабораторных животных.
6. Проведение экспертных исследований веществ, обладающих психоактивными свойствами.
7. Изготовление реактивов, титрованных растворов, индикаторов для производственных аптечных организаций, лабораторий.
8. Повышение квалификации специалистов аналитического профиля.

## ПОЧЕМУ К НАМ НАДО ОБРАТИТЬСЯ:

- ✓ Высокое качество работ
- ✓ Квалифицированный персонал
- ✓ Широкий ассортимент методов испытания
- ✓ Исполнение работ в установленные сроки
- ✓ Система менеджмента качества
- ✓ Любой вид испытательных работ по согласованию с заказчиком

## НАШИ ПРЕИМУЩЕСТВА:

- ✓ Современное аналитическое оборудование.
- ✓ Высококвалифицированные специалисты.
- ✓ Расширение направлений аналитической деятельности с применением химических, физико-химических, биологических, микробиологических методов.

РИЦ «Фарматест» сертифицирован в системе сертификации «Русский Регистр».

Руководитель РИЦ «Фарматест» – Малкова Тамара Леонидовна

### Контактные данные:

Адрес: г. Пермь, ул. Крупской, 46, корпус НИЦ

Тел.: (342) 282-58-65

Электронная почта: kaftox@mail.ru

Сайт: www.pfa.ru



## **РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Научно-производственный журнал

**2022. Том 11, № 4,  
приложение 1**

Специальный выпуск, посвященный ПГФА

## **DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION**

Research & production journal

**2022. Volume 11, No. 4,  
supplement 1**

Special issue dedicated to PGFA

## Цели и задачи журнала

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

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

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

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

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

В **пятом разделе** рассматриваются вопросы валидации методик, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Русинов В. Л.**, чл. корр. РАН, д. х. н., директор Химико-технологического института ФГАУ 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 ФГАУ 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 ФГАУ РУДН, Москва, Россия

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

**Сысуев Б. Б.**, доц., д. фарм. н., ФГАУ 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

**Тринева О. В.**, д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАУ 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
	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 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 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 registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal "Drug development & registration" (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization.

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

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

**The third section** describes analytical quality control methods.

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

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

---

### Editor-in-Chief

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

### Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

### Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<b>Print version founders</b>	<p>LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia</p> <p>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia</p> <p>Siberian State Medical University Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia</p>
<b>Online version founders</b>	<p>LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia</p>
<b>Publisher</b>	<p>LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC "CPHA") Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia</p>
<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>	<p>LC 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 e-mail: <a href="mailto:info@pharmjournal.ru">info@pharmjournal.ru</a></p>
<b>Printing house address</b>	<p>LLC "MAX PRESS" 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia</p>
<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> .....	20

### Поиск и разработка новых лекарственных средств

<b>Антигипоксическая активность 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2Н-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-онов</b> С. С. Зыкова, К. В. Намятова, К. Л. Ганькова, Е. А. Лысцова, Т. В. Шаврина, С. Н. Шуров .....	22
---	----

<b>Исследование антиоксидантной активности и квантово-химические расчеты 2-аминопирролов</b> С. С. Зыкова, К. Л. Ганькова, М. В. Шустов, Н. М. Игидов, С. С. Борисевич, М. Г. Ильина .....	27
---	----

<b>Фитостимулирующее действие продукта биодеструкции парацетамола на календулу лекарственную</b> Е. В. Вихарева, И. И. Мишенина, Е. Д. Гапечкина, А. А. Селянинов, М. И. Рычкова .....	31
---	----

<b>Синтез и оценка нестероидной противовоспалительной активности N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов</b> Н. А. Бузмакова, И. П. Рудакова, Т. М. Замараева, Н. В. Дозморова, Н. В. Слепова .....	38
--	----

<b>Изучение противогрибковой активности экспериментальных мягких лекарственных форм на основе гидразонопроизводного гетариламида 4-фенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислоты</b> Ф. В. Собин, Н. А. Пулина, В. В. Новикова .....	43
---	----

<b>Компонентный состав и противомикробная активность фракций из надземной части льнянки обыкновенной (<i>Linaria vulgaris</i> Mill.)</b> Т. В. Бомбела, О. А. Кроткова, Е. Е. Галишевская, А. Г. Анисимова, Т. А. Ягонцева, А. В. Агафонцева, В. В. Новикова, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, В. Г. Лужанин .....	48
---	----

### Фармацевтическая технология

<b>Определение фитотехнологических параметров экстракта густого персика обыкновенного (<i>Persica vulgaris</i>) листьев</b> Е. И. Молохова, Л. В. Иванцова, В. Д. Белоногова .....	57
---	----

<b>Изучение влияния технологического режима изготовления водного извлечения из шиповника плодов (<i>Rosae fructus</i>) на содержание аскорбиновой кислоты</b> Ф. В. Собин, Л. К. Коростелева, Т. А. Луткова, Н. В. Дозморова .....	64
---	----

### Методы анализа лекарственных средств

<b>Химический анализ основных групп биологически активных веществ в сборе седативного действия</b> Е. А. Замахеева, О. А. Олешко, О. В. Яборова, М. М. Смирнова .....	68
--	----

<b>Разработка и валидирование условий определения остаточных органических растворителей – уксусной кислоты в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она</b> Е. Н. Люст, О. В. Бобровская, В. Л. Гейн .....	73
---	----

<b>Сезонные изменения сорбционной активности полисахаридов сосны обыкновенной шишек (<i>Pinus sylvestris</i> L.)</b> Д. К. Гуляев, В. Д. Белоногова .....	79
--	----

<b>Разработка параметров стандартизации травы культивируемого вида манжетка мягкая (<i>Alchemilla mollis</i> (Buser) Rothm.)</b> В. Д. Бояршинов, Е. В. Зорина .....	85
---	----

<b>Валидационные испытания питательной среды Сабуро при определении противогрибковой активности впервые синтезированных соединений методом двукратных серийных разведений</b>	
---	--

В. В. Новикова, Н. А. Пулина, В. Г. Лужанин, Е. Р. Курбатов .....	91
<b>Аспекты стандартизации сока травы манжетки обыкновенной (<i>Alchemilla vulgaris</i>)</b>	
Е. В. Черемных, Е. В. Зорина, В. Д. Белоногова .....	99
<b>Доклинические и клинические исследования</b>	
<b>Исследование противовоспалительной активности новых лекарственных форм с ацизолом</b>	
А. Л. Голованенко, И. П. Рудакова, Е. С. Березина, И. В. Алексеева, Е. И. Молохова .....	105
<b>Изучение хронической токсичности земляники садовой (<i>Fragaria ananassa</i>) листьев экстракта сухого</b>	
О. В. Яборова, А. В. Курицын, В. Д. Белоногова, И. В. Алексеева .....	110
<b>Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа</b>	
О. А. Елисеева, М. А. Колганова, И. Е. Шохин, С. П. Дементьев, А. М. Власов, А. А. Замятнин, Н. С. Дубовик, А. Ю. Савченко, Н. В. Дозморова, В. Г. Лужанин .....	120
<b>Регуляторные вопросы</b>	
<b>Уничтожение наркотических средств и психотропных веществ как этап обращения лекарственных средств</b>	
Т. Л. Малкова, Е. С. Березина .....	128
<b>К вопросу эффективности работы отдела по регистрации лекарственных препаратов</b>	
А. В. Фотеева, Н. А. Конева, Н. Б. Ростова .....	133
<b>О формировании профессионально-специализированных компетенций и обучении специалистов и руководителей в системе фармаконадзора держателя регистрационного удостоверения</b>	
Е. Ю. Курганова, А. В. Солонина .....	139

## CONTENTS

<b>Introduction</b> .....	10
<b>Events</b> .....	20
<b>Research and development of new drug products</b>	
<b>Antihypoxic Activity of 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]quinnolin-3-ones</b> Svetlana S. Zykova, Kristina V. Namyatova, Kseniya L. Gankova, Ekaterina A. Lystsova, Tatiana V. Shavrina, Sergey N. Shurov .....	22
<b>Study of Antioxidant Activity and Quantum-chemical Calculations of 2-aminopyrroles</b> Svetlana S. Zykova, Kseniya L. Gankova, Maxim V. Shustov, Nazim M. Igidov, Sophia S. Borisevich, Margarita G. Ilyina .....	27
<b>Phyto-stimulating Effect of Paracetamol Biodestruction Product on Calendula Officinalis</b> Elena V. Vihareva, Irina I. Mishenina, Elizaveta D. Gapechkina, Alexander A. Selyaninov, Marina I. Rychkova .....	31
<b>The Synthesis and Evaluation of Non-steroidal Antiinflammatory Activity of N,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides</b> Nadezhda A. Buzmakova, Irina P. Rudakova, Tatiana M. Zamaraeva, Natalia V. Dozmorova, Nadezhda V. Slepova .....	38
<b>Study of Antifungal Activity of Experimental Soft Dosage Form Based on the Hydrazone Derivative of Getarylamide 4-phenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acid</b> Fedor V. Sobin, Natalya A. Pulina, Valentina V. Novikova .....	43
<b>Component Composition and Antimicrobial Activity of Fractions from the Aerial Part of Common Toadflax (<i>Linaria vulgaris</i> Mill.)</b> Tatyana V. Bombela, Olga A. Krotkova, Elena E. Galishevskaya, Alevtina G. Anisimova, Tatiana A. Yagontseva, Anastasiia V. Agafontseva, Valentina V. Novikova, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Ponkratova, Vladimir G. Luzhanin .....	48
<b>Pharmaceutical Technology</b>	
<b>Determination of Phytotechnological Parameters of the Dense Extract from Peach (<i>Persica vulgaris</i>) Leaves</b> Elena I. Molokhova, Lyubov V. Ivantsova, Valentina D. Belonogova .....	57
<b>Study of the Influence of the Technological Regime of the Production of Water Extraction from Rosehip Fruits (<i>Rosae fructus</i>) on the Content of Ascorbic Acid</b> Fedor V. Sobin, Ludmila K. Korosteleva, Tatyana A. Lutkova, Natalya V. Dozmorova .....	64
<b>Analytical Methods</b>	
<b>Chemical Analysis of the Main Groups of Biologically Active Substances in Sedative Collection</b> Ekaterina A. Zamakhaeva, Olga A. Oleshko, Olga V. Yaborova, Marina M. Smirnova .....	68
<b>Development and Validation of Conditions for the Determination of Residual Organic Solvents – Acetic Acid in the Silver Salt Substance 4-[4-(atsetilaminosul'fonil)fenil]-6-(4-bromfenil)-5- (2-nitrofenil)-3,5-digidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-ona</b> Elena N. Lyust, Olga V. Bobrovskaya, Vladimir L. Gein .....	73
<b>Seasonal Changes in the Sorption Activity of Water-soluble Polysaccharides in Scotch Pine Cones (<i>Pinus sylvestris</i> L.)</b> Dmitry K. Gulyaev, Valentina D. Belonogova .....	79
<b>Development of Quality Control Parameters for Standardization of Herb of the Cultivated Plant <i>Alchemilla mollis</i> (Buser) Rothm.</b> Vitaly D. Boyarshinov, Elena V. Zorina .....	85
<b>Validation Testing of Sabouraud Liquid Medium in Determining the Antifungal Activity of Newly Synthesized compounds by the Method of Two-fold Serial Dilutions</b> Valentina V. Novikova, Natalia A. Pulina, Vladimir G. Luzhanin, Evgeniy R. Kurbatov .....	91

<b>Aspects of Standardization in the Juice of the Herbs <i>Alchemilla vulgaris</i></b> Elena V. Cheremnykh, Elena V. Zorina, V. D. Belonogova .....	99
<b>Preclinical and clinical study</b>	
<b>Study of the Anti-inflammatory Activity of New Dosage Forms with Acyzol</b> Anna L. Golovanenko, Irina P. Rudakova, Elena S. Berezina, Irina V. Alekseeva, Elena I. Molokhova .....	105
<b>Study of Chronic Toxicity of Strawberry Garden (<i>Fragaria ananassa</i>) Leaves of Dry Extract</b> Olga V. Yaborova, Aleksey V. Kuritsyn, Valentina D. Belonogova, Irina V. Alekseeva .....	110
<b>Development and Validation of the ELISA Method for Anti-trastuzumab Antibodies Determination in Human Serum</b> Olga A. Eliseeva, Maria A. Kolganova, Igor E. Shokhin, Sergey P. Dementyev, Alexander M. Vlasov, Andrey A. Zamyatnin, Natalia S. Dubovik, Alla Yu. Savchenko, Natalia V. Dozmorova, Vladimir G. Luzhanin .....	120
<b>Regulatory Issues</b>	
<b>Destruction of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances as a Stage of Circulation of Medicines</b> Tamara L. Malkova, Elena S. Berezina .....	128
<b>On the Issue of the Effectiveness of the Department for Registration of Medicines</b> Alexandra V. Foteeva, Nataliia A. Koneva, Natalya B. Rostova .....	133
<b>On the Formation of Professionally Specialized Competencies and Training of Specialists and Managers in the Pharmacovigilance System of the Marketing Authorization Holder</b> Evgeniia Yu. Kurganova, Anna V. Soloninina .....	139

Редакционная статья / Editorial article

## О Пермском центре кластерного развития фармацевтической отрасли «ПАРМА»

9 ноября 2022 года между Правительством Пермского края, ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России (далее – ПГФА) и Автономной некоммерческой организацией «Пермский научно-образовательный центр мирового уровня «Рациональное недропользование» (далее – Пермский НОЦ) заключено Соглашение о создании Пермского центра кластерного развития фармацевтической отрасли «ПАРМА» (далее – ЦКР ПАРМА). Цель Соглашения создание материально-технической, научно-технологической и интеллектуальной среды, обеспечивающей оказание широкого спектра образовательных и научных услуг в рамках функционирования полного цикла жизни фармацевтической продукции (от разработки до реализации).

## About the Perm Cluster Development Center Pharmaceutical Industry "PARMA"

On November 9, 2022, between the Government of the Perm Territory, the Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia (hereinafter referred to as PGFA) and the Autonomous Non-Profit Organization "Perm Scientific and Educational Center of the World Level "Rational Subsoil Use" (hereinafter referred to as the Perm REC) signed an Agreement on the establishment of the Perm Center cluster development of the pharmaceutical industry "PARMA" (hereinafter - CKR PARMA). The purpose of the Agreement is to create a material and technical, scientific, technological and intellectual environment that ensures the provision of a wide range of educational and scientific services within the framework of the full life cycle of pharmaceutical products (from development to sales).

### ВИДЫ УСЛУГ ЦКР ПАРМА:

1. Практикоориентированная подготовка кадров в системе высшего и среднего профессионального образования.
2. Дополнительное профессиональное образование.
3. Разработка научно-технологической продукции:
  - новые запатентованные молекулы с установленной биологической активностью – потенциальные лекарственные кандидаты;
  - лабораторные регламенты получения (химический синтез/выделение из природного сырья) фармацевтических субстанций;
  - промышленные регламенты получения (химический синтез/выделение из природного сырья) фармацевтических субстанций;
  - доклинические испытания фармацевтических субстанций (протоколы оценки безопасности и эффективности);
  - лекарственные формы активных фармацевтических субстанций (техническое обоснование, разработка);
  - мелкие серии опытно-промышленных образцов фармацевтической продукции;
  - доклинические испытания опытно-промышленных образцов фармацевтической продукции (протоколы оценки безопасности и эффективности).
4. Контроль качества фармацевтической продукции в рамках функционирования полного жизненного цикла (от разработки до реализации).

5. Услуги в области регуляторики и экспертной деятельности фармацевтической отрасли.

### ЗАДАЧИ ЦКР ПАРМА:

1. Создание инновационной практикоориентированной научно-образовательной среды для подготовки высококвалифицированных кадров в сфере лекарственного обеспечения и фармацевтического производства посредством организации целевого фармацевтического консорциума вузов и работодателей Пермского края.
2. Обеспечение трансфера технологии фармацевтической разработки и производства из научно-образовательной в предпринимательскую среду. Расширения портфеля производимой отечественной продукции, в том числе за счет оригинальных препаратов.
3. Обеспечение лекарственной безопасности Российской Федерации и технологического суверенитета посредством импортозамещения на отечественном отраслевом фармацевтическом рынке, преодоление дефицита отечественных фармацевтических субстанций и оригинальных лекарственных препаратов.
4. Создание благоприятного экономического и инвестиционного климата для развития фармацевтической отрасли Пермского края. Продвижение бренда «Пермь – фармацевтическая столица России», как одной из основных базовых научно-технологических и экономических платформ региона.

### Принципиальная схема работы:



### ЗАКАЗЧИКИ УСЛУГ ЦКР ПАРМА:

Предприятия и организации фармацевтической отрасли Российской Федерации – фармацевтические производители, аптечные сети, аптечные склады, отраслевые научно-производственные объединения, органы государственного контроля (Росздравнадзор и др.)

### УЧАСТНИКИ ЦКР ПАРМА:

- ✓ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России – как ведущий отраслевой вуз.
- ✓ Вузы и научно-исследовательские институты Пермского края.
- ✓ Ведущие отраслевые предприятия Перми и Пермского края (Фармацевтическая компания «Меди-

- ✓ сорб», Пермское НПО «Биомед», ООО «Пемская химическая компания»).
- ✓ Ведущие аптечные сети и производители экстерпоральных лекарственных форм («Планета здоровья», «Пермфармация», «Межбольничные аптеки», «Аптеки «От склада»» и др.).
- ✓ Региональные органы государственной власти: Министерство здравоохранения Пермского края, Министерство промышленности, предпринимательства и торговли Пермского края, Министерство образования и науки Пермского края.
- ✓ Предприятия и организации фармацевтической отрасли Российской Федерации.

### УНИКАЛЬНОСТЬ ЦКР ПАРМА:

- ✓ Наличие профильного образовательного учреждения (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России) с действующими отраслевыми образовательными и научными школами.
- ✓ Широкая научно-практическая база по поиску и разработке биологически активных молекул синтетического происхождения в вузах и научно-исследовательских институтах Пермского края.
- ✓ Широкая ресурсная база Пермского края для поиска и разработки биологически активных молекул природного происхождения.
- ✓ Наличие крупных федеральных отраслевых организаций и предприятий – ведущих бенефициаров фармацевтической отрасли России.

- ✓ Промежуточным продуктом разработки могут служить биологически активные добавки, пищевые и кормовые добавки, ветеринарные препараты.
- ✓ Межотраслевой потенциал ЦКР ПАРМА (химическая, пищевая, сельскохозяйственная и медицинская промышленности).
- ✓ Высокий потенциал развития фармацевтической промышленности в регионе за счет наличия сильного научно-образовательного базиса и возможности создания благоприятных экономических условий.

### ФИНАНСОВАЯ МОДЕЛЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦКР ПАРМА:

Основными индикаторами эффективности проекта являются количество разработанных и переданных для внедрения в производство в организациях, действующих в реальном секторе экономики, конкурентоспособных технологий и заказов на выполнение научно-исследовательских работ. Финансирование работ по разработке технологий и выполнению научно-исследовательских работ осуществляется заказчиком, являющимся участником ЦКР ПАРМА, в размере 75 % от стоимости работ. 25 % от стоимости работ обеспечивается средствами гранта Пермского НОЦ. Основным отраслевым исполнителем работ является ПГФА. Иные образовательные и научно-исследовательские организации, являющиеся участниками ЦКР ПАРМА, принимают квалифицированное участие в выполнении работ на основании договоров подряда.

УДК 615.378.1

Редакционная статья / Editorial article

## Анализ исторических этапов деятельности Пермской государственной фармацевтической академии

М. Н. Гурьянова ✉, Е. С. Мезенцева, 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

✉ Контактное лицо: Гурьянова Марина Николаевна. E-mail: muzei.pgfa@yandex.ru

ORCID: М. Н. Гурьянова – <https://orcid.org/0000-0001-7378-8060>; Е. С. Мезенцева – <https://orcid.org/0000-0003-4107-333X>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

### Резюме

В 2022 году ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия (ПГФА) отмечает свой 85-летний юбилей. Хранителем истории академии является ее музей. Задачами музея являются: накопление и сохранение памяти о развитии вуза, его значимых выпускниках, распространение информации об истории вуза среди обучающихся, выпускников, абитуриентов и других группах посетителей. Одновременно музей ПГФА проводит и анализ данных, характеризующих отдельные этапы истории возникновения и функционирования вуза. Проведение подобного анализа позволяет найти и оценить тенденции развития вуза, выбрать направления развития отдельных направлений деятельности, которые можно было бы использовать вновь. Цель исследования – выделение и анализ тенденций развития Пермской государственной фармацевтической академии в период с 1937 по 2022 год. В качестве объектов исследования были использованы: приказы по вузу, хранящиеся в архиве ПГФА; отчеты вуза, хранящиеся в архиве музея ПГФА; протоколы партийных собраний, газетные и журнальные публикации, воспоминания ветеранов вуза. Методами исследования явились: документальный анализ, методы однофакторного анализа: сводка, группировка. В ходе исследования изучены исторические периоды существования Пермской государственной академии, как самостоятельного фармацевтического вуза. Предложены и использованы позиции сбора и оценки отдельных параметров характеристики деятельности вуза. Это позволило оценить изменения в деятельности вуза по предложенным позициям. Проведен анализ деятельности Пермской государственной фармацевтической академии исторических периодов. Собран и проанализирован большой фактографический материал по таким разделам, как: руководство вузом, развитие материально-технической базы, формы обучения студентов, направления научных исследований, воспитательная работа студентов и другие.

## The Analysis of Historical Stages of the Perm State Pharmaceutical Academy

Marina N. Guryanova ✉, Ekaterina S. Mezentseva, 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

✉ Corresponding author: Marina N. Guryanova. E-mail: muzei.pgfa@yandex.ru

ORCID: Marina N. Guryanova – <https://orcid.org/0000-0001-7378-8060>; Ekaterina S. Mezentseva – <https://orcid.org/0000-0003-4107-333X>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

### Abstract

In 2022, the Perm State Pharmaceutical Academy (PSFA) celebrates its 85th anniversary. The Academy's museum is the guardian of the Academy's history. The objectives of the museum are: accumulation and preservation of memory about the development of the university, its significant graduates, dissemination of information about the history of the university among students, graduates, applicants and other groups of visitors. At the same time, the PGFA museum also analyzes data characterizing individual stages in the history of the emergence and functioning of the university. Carrying out such an analysis allows one to find and evaluate the development trends of the university, to choose the directions for the development of individual areas of activity that could be used again. The purpose of the study – identification and analysis of development trends of the Perm State Pharmaceutical Academy in the period from 1937 to 2022. The following were used as objects of study: orders for the university, stored in the archives of the PSFA; university reports stored in the archives of the PGFA museum; protocols of party meetings, newspaper and magazine publications, memoirs of university veterans. The research methods were: documentary analysis, methods of one-factor analysis: summary, grouping. In the course of the study, the historical periods of the existence of the Perm State Academy as an independent pharmaceutical university were studied. The positions of collecting and evaluating individual parameters of the characteristics of the university's activities are proposed and used. This made it possible to evaluate changes in the activities of the university in terms of the proposed positions. An analysis of the activities of the Perm State Pharmaceutical Academy of historical periods was carried out. A large amount of factual material has been collected and analyzed in such sections as: university management, development of the material and technical base, forms of student education, areas of scientific research, educational work of students, and others.

В настоящее время в Российской Федерации востребованы исследования по разработке и созданию новых лекарственных средств, созданию новых методик анализа лекарственных средств, организации новых фармацевтических логистических и промышленных предприятий. Задача подготовить специалистов для решения задач ложится на плечи фармацевтиче-

ских образовательных организаций. Одной из которых является старейший фармацевтический вуз страны – Пермская государственная фармацевтическая академия.

В 2022 году ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия (ПГФА) отмечает свой 85-летний юбилей. Свой отсчет ПГФА ведет с

1937 года, когда 1 января 1937 года началось государственное финансирование нового созданного вуза, получившего название Пермский фармацевтический институт (ПФИ). Однако необходимо выделить не только этапы развития ПФИ с 1937 года, но и предшествующие этому события. Знакомым событием является открытие центра фармацевтического образования на Урале – фармацевтического отделения (ФО) при физико-математическом факультете Пермского университета в октябре 1918 года. Открытие центра подготовки провизоров было тесно связано с ситуацией «Лекарственного голода» в стране. Фармацевтический рынок России в начале XX века был сформирован на основе импортных лекарственных препаратов, в основном производства Герман или Соединенных Штатов Америки, но и там поставщиками являлись филиалы германских фирм. С августа 1914 года поставки готовых лекарственных препаратов с заводов Германии и их американских филиалов были прекращены. Даже поставка африканского и американского лекарственного растительного сырья производилась традиционно через Гамбург, с началом войны этот канал снабжения был перекрыт Германией. Во второй половине 1914 года еще использовались запасы, накопленные до войны. С началом 1915 года эти запасы были сведены к нулю, и пред нашей химической промышленностью полностью встал вопрос о необходимости развивать собственное производство, чтобы без помощи иностранного ввоза удовлетворить разнообразные и многочисленные нужды страны<sup>1</sup>. ФО было создано по инициативе Пермского губернского Союза служащих фармацевтов и при поддержке, направленного из Военно-медицинской академии в Пермь для чтения лекций магистра фармации Н.И. Кромера. Решение об открытии ФО было принято Наркомпросом РСФСР 16.07.1918 года. Установлены цели деятельности созданного отделения в соответствии с новыми нормативными документами<sup>2</sup>: «подготовка специалистов высшей квалификации в аптечном деле, для заводских предприятий по изготовлению лекарственных препаратов и химиков, обслуживающих коммунальное хозяйство в деле питания, санитарии и лекарственной помощи населению», а также подготовка «преподавательского персонала для фармвузов и фармтехникумов». В этот период была разработана учебная программа для студентов отделения, она включала комплекс дисциплин: на изучение неорганической, органической и фармацевтической химии было отведено 504 часа; на преподавание анатомии, ботаники, гигиены, фармакологии, физиологии выделялось 216 часов; в число специальных предметов были включены – история аптечного дела с фармацевтиче-

ским законодательством, рецептура, фармакогнозия, всего на эти предметы отводилось в учебном плане 84 часа. Также были определены основные направления научных исследований: фармакогностическое и химическое. Первоочередной задачей считалось изучение культуры лекарственных растений в условиях западного Урала в связи с острой потребностью в лекарственных препаратах. Работа возглавлялась магистрами фармации Н.И. Кромером и Э.К. Мезингом. Химическое направление возглавляли магистр фармации Н.И. Кромер и профессор Э.В. Змачинский. Тематика работ включала химико-технологические, аналитические, судебно-химические вопросы, проводилось изучение местных минеральных вод и др. Студенты участвовали в научных исследованиях. При фармацевтическом отделении была открыта аспирантура. Организаторским направлением деятельности отделения была помощь практической фармации и медицине: организация фармацевтического техникума в г. Пермь, создание курсов повышения квалификации для фармацевтических работников Уральской области, приготовление на базе своих химических лабораторий и кафедры технологии лекарств сложных фармацевтических препаратов для аптек города. производство судебно-химических анализов. В течение последующих 18 лет центр фармацевтического образования менял свое название и статус: 1921 г. – самостоятельный фармацевтический институт в составе медицинского факультета, 1923 г. – химико-фармацевтическое отделение медицинского факультета, 1929 г.– химико-фармацевтический факультет, 1930 год – самостоятельный химико-технологический институт, 1931–1936 год – фармацевтический факультет при Пермском медицинском институте<sup>3</sup>.

Открытие самостоятельного вуза связано с плачевной ситуацией, сложившейся в фармацевтической отрасли страны в начале 30-х годов. Характеристике этой ситуации была посвящена разгромная речь Г.Н. Каминского на 16 Всероссийском съезде Советов 20 января 1935 г. В результате в 1936 году было принято постановление Совета народных комиссаров, в соответствии с которым было открыто 9 самостоятельных фармацевтическим институтам, в том числе Пермский<sup>4</sup>. Финансирование ПФИ было начато с 1 января 1937 года. Временно исполняющим обязанности директора ПФИ в переходный период реорганизации был назначен директор медицинского института П.П. Сумбаев. Впоследствии он длительное время был преподавателем – совместителем Пермского (Молотовского) фармацевтического ин-

<sup>3</sup> Отчет бюро химико-фармацевтического факультета ПГУ за 1928 год. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>4</sup> Постановление СНК от 8 сентября 1936 г. № 1649 «О подготовке средних медицинских, зубоврачебных и фармацевтических кадров».

<sup>1</sup> Хроника. *Фармацевтический журнал*. 1916;3:29–30.

<sup>2</sup> Постановление НКВД РСФСР от 30.01.1918 «Об изменении и расширении профессиональных прав фармацевтов». Справочник по фармацевтическому законодательству. М: Издательство Наркомздрава РСФСР; 1927.

ститута. Первым деканом – Н. Н. Калугин. В марте 1937 года в ПФИ был направлен в качестве директора А. М. Креймер. С 1 октября 1940 года институт возглавил заведующий кафедрой фармакологии, профессор Сангайло А. К. С 1944 по 1953 гг. директор Молотовского (Пермского) фармацевтического института являлся доцент кафедры фармацевтической химии Н. Н. Калугин. В тридцатые годы у вуза не было даже собственного здания – занятия проводились на базе медицинского института (ул. Коммунистическая, д. 30) и Пермского университета. Студенты проживали на квартирах или в общежитии-бараке медицинского студенческого городка. Отдельное здание по адресу ул. Ленина, д. 48 (бывшее здание Рождество-Богородицкой церкви) вуз получил в августе 1941 года в связи с передачей корпуса медицинского института (где проходили занятия студентов вуза) под госпиталь. В 1937 г. в составе ПФИ были организованы 13 кафедр: ботаники, фармакологии, фармакогнозии, неорганической и аналитической химии, органической химии, физической и коллоидной химии, фармацевтической химии, технологии лекарственных форм и галеновых препаратов, физики, военно-санитарных наук, судебной химии, марксизма-ленинизма, физкультуры. При кафедрах существовали курсы микробиологии, зоологии, латинского языка, анатомии и физиологии, высшей математики, организации фармацевтического дела. В 1937 году многие дисциплины велись на территории и силами преподавателей медицинского института. В первый год существования вуза 87 % сотрудников были совместителями, к весне 1941 г. уже 58 % сотрудников являлись штатными работниками. В 1930-е годы в СССР развернулась активная работа по оформлению института аспирантуры как основной формы подготовки научных и научно-педагогических кадров. Постановление ЦК ВКП (б) и СН К СССР «О работе высших учебных заведений и руководстве высшей школой» от 21 мая 1936 г. требовало организовать научно-исследовательскую работу в вузах. Первыми аспирантами, зачисленными на кафедры ПФИ стали (приказ № 6 от 19.02.1937): по кафедре фармацевтической химии: А. В. Банникова, А. М. Глаголева, Н. Г. Панферова; по кафедре фармакогнозии: Л. М. Чазова, В. Н. Красулина, Л. И. Кобелева, Е. И. Гаврилова; по кафедре технологии лекарственных форм и галеновых препаратов: З. М. Митягина, Ю. П. Старикова. Все аспиранты обеспечивались государственной стипендией. За первые четыре года существования ПФИ 5 сотрудникам присуждены ученые степени. Основной формой обучения студентов являлась очная форма. Однако в архиве музея хранятся документы, свидетельствующие о том, что с 1938 года по 1949 гг. в вузе существовал экстернат для фармацевтических специалистов, имеющих среднее фармацевтическое образование, либо опыт работы в качестве аптекарского ученика. За этот период экстерном звание провизора в Пермском (Молотовском) фармацевтическом институте

получили 77 человек. Ежегодный набор на очную форму обучения составлял около 100 человек. На первый курс в 1937 года на очную форму обучения было зачислено 93 человека, в том числе юношей 20 человек, девушек 73 человека.

Тяжелым испытанием для Молотовского фармацевтического института (МФИ) (с 1940 года по 1957 г. город назывался Молотов) стали военные годы. Уже в первые месяцы войны были призваны в РККА многие сотрудники и студенты вуза. В г. Молотов в 1941–1943 году приехали или были организованно эвакуированы преподаватели и студенты из разных фармацевтических вузов: Московского, Ленинградского, Днепропетровского, Ташкентского, фармацевтического отделения Рижского университета. 29 октября 1941 года к МФИ был присоединен Московский фармацевтический институт. В коллектив института влились эвакуированные научные работники: М. Х. Бергольц, Д. М. Щербачев, С. Ф. Юшкевич, Я. З. Лемберский, П. И. Астраханцев, Н. А. Львов. Их пребывание в институте оказало влияние на учебную, воспитательную и научную работу. В 1941–1942 уч. году на первый курс было принято 150 человек, приемные экзамены были организованы дважды: в августе и в январе. Программа обучения была сокращена до 2 лет. Студенты учились по уплотненному графику. В 1942 году прием составил 248 человек, в 1943 г. – 213 человек. Всего за годы войны принято в МФИ 730 человек. В годы войны в программу был введен ряд новых предметов, таких как «Обучение военной топографии» (110-часов) на кафедре Военно-санитарной подготовки. В годы войны МФИ окончило свыше 50 % провизоров от числа выпускаемых всеми вузами страны.

Седьмая сессия областных депутатов трудящихся Молотовской области в декабре 1941 года обязало руководство вузов выработать до 40 наименований медикаментов из местного сырья, решать актуальные вопросы науки и практики военного времени. В годы войны в МФИ научные исследования проводились по следующим направлениям: деятельность по организации выпуска субстанций для производства лекарственных препаратов и созданию новых лекарственных препаратов на базе заводов Молотовской области (МО); деятельность по выпуску лекарственных препаратов, медицинских изделий и средств гигиены на базе предприятий местной промышленности МО; картирование зарослей лекарственных растений; поиск лекарственных растений заменителей импортных растений и растений, произрастающих в южных и западных территориях СССР; поиск растений, позволяющих обеспечить импортозамещение в нелекарственных направлениях промышленности; организация производства химических реактивов на базе имеющихся заводов МО. С 17 октября на базе МФИ на основании отношения наркома здравоохранения № щ3-25/93 от 17 октября 1941 г. был эвакуирован ученый секретарь Фармакопейного комитета Союза СССР доктор биологических наук А. И. Зиль-

берберг. Он организовал на базе вуза работу групп Фармакопейного комитета. Большая работа проводилась сотрудниками МФИ по изучению лекарственных растений и возможности замены импортного дорогостоящего лекарственного растительного сырья на отечественное, произрастающее в зоне Урала. В рамках этого направления Д. М. Щербачев провел исследование анатомического строения стеблей и цветков травы термопсиса, предложил его заготовку и использование, как противокашлевого средства, заменив ипекакуану, закупаемую за рубежом. Е. И. Гаврилова – ассистент кафедры фармакогнозии изучала бересклет бородавчатый с целью замены гуттаперчи. С открытием свойств бересклета СССР перестал зависеть от импорта гуттаперчи. Работу по выпуску неорганических субстанций на базе предприятий Молотовской области возглавил преподаватель кафедры технологии лекарственных форм и галеновых препаратов В. М. Силин. Был организован выпуск стрептоцида на содовом заводе г. Березники (1942 г.), участниками и организаторами выпуска стрептоцида являлись сотрудники кафедры фармацевтической химии – заведующий данной кафедрой М. Х. Бергольц и ассистент кафедры Н. Г. Панферова. З. М. Митягина ассистент кафедры технологии лекарственных форм получила новые препараты из местного дубильного сырья: бистиодин, бистальбин, бистиформ. Производство данных препаратов было организовано на Пермской галеновой фабрике, мясокомбинате и Томском химико-фармацевтическом заводе. Все направления научных исследований и организацию производства лекарственных препаратов МФИ проводил в тесной связи с Молотовским аптекоуправлением<sup>1,2,3</sup>.

В послевоенные годы в вуз возвращаются демобилизованные студенты и преподаватели. Накопленные в годы войны знания и опыт, позволили многим преподавателям уже в послевоенные годы оформить результаты их научных исследований в диссертационные работы. В 1940–1950 годы в институте проводились научные работы по 3 направлениям: изыскание новых синтетических лекарственных средств и связь химического строения их с действием; изучение лекарственной флоры СССР (Молотовской области); разработка новых методов исследования лекарственных веществ и усовершенствования уже существующих.

<sup>1</sup> Копии приказов по Молотовскому фармацевтическому институту за 1937–1945 гг. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>2</sup> Копии приказов по Молотовскому (Пермскому) фармацевтическому институту 1946–2022 гг. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>3</sup> Митягина З. М. Высшее фармацевтическое образование на Урале. Тезисы докладов научной историко-медицинской конференции урало-сибирской областей (24–27 мая 1962 г.). Пермь. 1962. С. 13–15.

щих. В 1953 году в числе преподавателей ВУЗа было 3 профессора и 13 кандидатов наук. Третьего апреля 1949 года было создано студенческое научное общество (СНО). Первым председателем СНО был избран студент В. Э. Колла. Научным руководителем назначен Н. Г. Колташев (заведующий кафедрой физической и коллоидной химии). СНО объединило 10 научных студенческих кружков, в которых занимались 113 студентов. Уже к 1951 году СНО насчитывало 250 студентов и объединяло 14 кружков. Работы студентов регулярно получали награды Министерства здравоохранения РСФСР, Обкома ВЛКСМ, Министерства высшего и среднего образования СССР. Основополагающей в области научных исследований становится кафедра органической химии, которую возглавил П. А. Петюнин, ввергнувшийся в вуз после демобилизации в 1945 году. Им были определены принципы ацидохромной конденсации с точки зрения природы арильных радикалов, установлен механизм ее протекания. Получены новые реагенты – димагнезиламины, изучены их реакции с эфиром и галоидангидами карбоновых кислот. Под его руководством были защищены кандидатские диссертации: И. С. Бердинский – 1948 г., Н. Г. Панферова – 1952 г., В. С. Шкляев – 1952 г., М. Е. Коньшин – 1958 г., Л. А. Тютюева – 1959 г., Ю. В. Кожевников – 1960 г., М. С. Ходырева – 1963 г., А. В. Сторожева – 1963 г., М. В. Заколюжный – 1964 г., З. Г. Калугина – 1964 г. Большой вклад в развитии химии как науки внес доцент кафедры органической химии Бердинский Иван Сергеевич<sup>4</sup>.

В 1953 году на пост директора института был назначен В. С. Шкляев. После войны многие вузы оказались в тяжелом положении. В архиве ПГФА хранится паспорт института за 1960 год, в нем характеризуется материальная база вуза: учебный корпус – один: переоборудованное здание церкви с полезной площадью 1200 кв. (арендовано у Горисполкома); учебные помещения – в зданиях медицинского института (в них располагаются кафедры физики, физической и коллоидной химии, фармакологии, физиологии, микробиологии и гигиены), общежитие – барачного типа (подлежит сносу), столовой нет, клуб для студентов отсутствует<sup>5</sup>. Но в конце 1950-х годов В. С. Шкляев сумел начать работу по улучшению материально-технической базы вуза. В 1961 году для студентов построено благоустроенное общежитие на 200 мест по адресу: ул. Куйбышева, 49. Созданный в Верхне Чусовских городках питомник лекарственных растений в 1962 году переведен в район Ба-

<sup>4</sup> Отчеты презентации кафедр Пермской фармацевтической академии. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>5</sup> Паспорт Пермского фармацевтического института 1960 год. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

кинститута. В нем культивировалось более 300 лекарственных средств. В начале 1960-х годов год в вузе работало 15 кафедр. В 1950–1960 годы прием на первый курс составлял 100 человек. На 1960 год научные исследования проводились по следующим направлениям: изыскание новых синтетических лекарственных средств и связь химического строения с их действием; изучение флоры РСФСР; изучение новых и совершенствование существующих химических и физико-химических методов анализа; совершенствование лекарственных форм и лекарственных препаратов. В 1962 году ПФИ возглавил выпускник вуза, фронтовик О. К. Козьминых, который продолжил работу по развитию материальной базы вуза. В 1966 году по приказу министерства здравоохранения в ПФИ организуются новые кафедры на основе имеющихся самостоятельных курсов: экономики и организации фармацевтического дела, фармакологии и физиологии, ботаники с курсом микробиологии, физической химии с курсами физики и основ высшей математики, физического воспитания, неорганической химии, аналитической химии. В связи организацией обучения студентов по заочной форме обучения в 1970-х гг. были сформированы кафедры факультета специализации и усовершенствования провизоров и заочного обучения. В 1954–1955 уч. году в вузе открывается заочное отделение. Первый прием на заочное отделение составил 100 человек. Среди поступивших в 1954 году было много военных фармацевтов и фельдшеров-начальников аптек. В учебный план были включены 25 предметов, предусмотрено выполнение 72 контрольных работ, двух курсовых работ, сдача 25 экзаменов и 23 зачетов. Первый выпуск заочного отделения состоялся в 1960 году. Заочное отделение окончил 71 человек, из них один с красным дипломом. Выпускники заочного отделения становились начальниками аптечных управлений: Кирова, Чувашии, Барнаула, Владимира и др. В декабре 1965 года вуз получил долгожданный лабораторный корпус, государственная комиссия приняла его с оценкой «хорошо». В корпусе были размещены химические, технологические кафедры, кафедра физики и математики.

Корпус сразу стал не только местом обучения студентов, но и местом организации встреч и мероприятий фармацевтов Пермской области. В октябре 1970 года при ПФИ В. Т. Селезнёва организовала 2-годичный университет для врачей и для фарм. Специалистов. С 1966 г. преподавателями института проводились занятия по повышению квалификации преподавателей фармацевтических училищ и фармацевтических факультетов Уральского, Приволжского и Западно-Сибирского регионов. Семинар провизоров-аналитиков контрольно-аналитических лабораторий положил начало организации факультета специализации и усовершенствования провизоров (ФСУП). Он был открыт в 1972 г., некоторое время факультет был единственным в стране. Повышение квалифика-

ции проводилось по циклам: провизор-технолог, провизор-аналитик, провизор-организатор.

В 1968 году стараниями И. П. Софроновой открывается фармацевтический музей. И. П. Софронова провела исследования на базе архива Пермской области, организовала экспедиции по районам Пермской области, нашла в старинных аптеках множество артефактов, которые составили основу фонда музея ПГФА.

В 1973 году в Пермском фармацевтическом институте создается кафедра технологии ФСУП и заочного отделения. Ее первым заведующим стал Илья Степанович Ажгихин. Возглавил перспективное научное направление по биологическому синтезу простагландинов и их предшественников.

С 1970 года появились свои направления научной работы на кафедре физической культуры: «Взаимодействие умственной и физической работоспособности студентов» и «Совершенствование методов тренировки в лыжном спорте».

В 1979 году было открыто подготовительное отделение. На нем ежегодно обучалось до 100 рабфаковцев. В 1971 году построено новое общежитие № 2, общей площадью 6453 кв. м. на 848 мест. В 1972 г. – построен учебный корпус кафедр физиологии и фармакологии, в 1974 году освоено помещение под виварий. С 1970-х годов вуз ежегодно принимал на первый курс по 400 человек, как очную, так и на заочную форму обучения.

В 1980-е и 1990-е годы произошел рывок в развитии вуза и его материально-технической базы. Это связано с именами двух ректоров: Л. Ф. Яковлевой и Г. И. Олешко. С 1983 г. по 1989 г. вуз возглавляла Л. Ф. Яковлева. Ее усилиями вуз построил 9-этажное благоустроенное общежитие, корпус для кафедр фармакологии и физиологии, начал реализовываться проект по строительству нового учебного корпуса. С 1989 г. по 2010 г. ректора вуза являлся Г. И. Олешко. По его инициативе с 1992 года вуз начинает обучение иностранных граждан. В 1993 году организован факультет подготовки иностранных граждан (ФПИГ) как самостоятельное подразделение вуза, его возглавил факультет Ю. А. Хомов. Абсолютное большинство выпускников ФПИГ успешно подтверждают свои дипломы и работают по специальности на Родине или других государствах (Германия, Нидерланды, США, Канада, Россия). Некоторые из выпускников занимают ведущие государственные или общественные должности на различных уровнях – Кабаа Абдулкадер (Сирия) и Лрорфи Назих (Марокко) – выпускники 1997 г., Бастун Жамаль (Марокко) – выпуск 1999 г. Успешно защитили кандидатские диссертации: Дайех Мохаммад (Сирия, 2006), Аффуф Абдулкарим Башар (Сирия, 2020)<sup>1</sup>. В результате в 1995 году вузу было присвоено название «Пермская государственная фар-

<sup>1</sup> Юбилейные альбомы кафедр Пермского фармацевтического института. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

мацевтическая академия» (ПГФА). В 1990–2000 годы прием студентов на первый курс составлял до 600 человек. Под руководством Г. И. Олешко в 1980–1990 годы в вузе были организованы всесторонние комплексные ресурсоисследовательские исследования в соответствии с договорами, заключенными в областными аптекоуправлениями, были проведены по Горьковской, Пермской, Свердловской, Челябинской, Пензенской областях. Начиная с 1990-х годов XX в. и 2000-х годов XXI века всесторонние комплексные исследования флоры Среднего Урала и Пермского края были продолжены под руководством профессора В. Д. Белоноговой.

Начало XXI века для ПГФА связано с открытием новых подразделений, новых специальностей, новых направлений подготовки специалистов. При участии пермского НПО «Биомед» в 2004 г. в ПГФА открылась кафедра промышленной технологии с курсом биотехнологии (первый заведующий А. В. Казьянин). Преподаватели кафедры промышленной технологии выступили организаторами и разработчиками программ по направлениям подготовки «Биотехнология» и «Химическая технология». В 2016 г. открылись новые направления подготовки: 19.03.01 «Биотехнология» и 18.03.01 «Химическая технология». Первый набор биотехнологов состоялся в 2016 г., химтехнологов – в 2017 г. С целью осуществления первичной одногодичной последипломной специализации выпускников фармацевтических институтов с 1 сентября 1994 г. была организована интернатура при ФСУП (первый заведующий – Л. К. Бабиян). Первый прием в интернатуру ПФИ произведен в 1994 году. Первый выпуск интернов в количестве 19 человек состоялся 31 июля 1995 года. Подготовку в интернатуре академии прошло более 6 тыс. фармацевтических специалистов из России (от Архангельска до Владивостока) и из-за рубежа. А с 2016 года на базе вуза осуществляется первичная аккредитация фармацевтических специалистов уровень специалитета, с 2021 г. – уровень среднего профессионального образования, а также первичная аккредитация после ординатуры и профессиональной переподготовки.

В 1990-е годы в ПГФА было организовано новое подразделение – региональный испытательный центр «Фарматест», аккредитованный на контрольно-аналитическую деятельность по оценке соответствия лекарственных средств и пищевых продуктов. Он был создан по инициативе и под руководством к. хим. н., заведующий кафедрой токсикологической химии (с 1996 по 2001 гг.) Л. О. Коньшиной. В настоящее время руководителем центра «Фарматест» является д. фарм. н. Т. Л. Малкова. Ежегодно по инициативе Т. Л. Малковой ПГФА организует успешно проводит Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами». Конференция прово-

дится при поддержке Прокуратуры Пермского края, Управления МВД по Пермскому краю, Министерства здравоохранения Пермского края, Министерства образования Пермского края. В рамках конференции обсуждаются современные вопросы химико-токсикологического и судебно-химического анализа, проблемы использования лекарственных средств в немедицинских целях, злоупотребления новыми психоактивными веществами. С 2009 года на базе ФГБОУ ВО ПГФА работает экспериментальная микробиологическая лаборатория, имеющая лицензию на работу с микроорганизмами 3–4 группы патогенности. В 2000 году на базе подготовительного отделения был открыт новый факультет – факультет довузовской подготовки молодежи (ФДПМ). Первым деканом стала В. М. Томилова (2000–2016 г.)<sup>1</sup>. При создании факультет его руководители поставили своей целью обобщить и проанализировать весь ранее накопленный вузом опыт профориентационной работы по привлечению абитуриентов к профессии провизора. Сотрудники организуют работу фармацевтических классов, летние лагеря для абитуриентов. ФДПМ ПГФА первым в крае создали методики и организовал проведение уроков-проб. Регулярно проводятся мероприятия с молодежью, их знакомят с фармацевтическими специальностями, академией и научной деятельностью: День науки, конференции, олимпиады, экскурсии, дни открытых дверей, лагерь «Юный провизор».

С 2017 года в академии проводится набор на обучение по программам среднего профессионального образования по специальности 33.02.01 «Фармация». В последующие годы ПГФА возглавляли Е. В. Орлова, д. фарм. н., профессор; А. Ю. Турышев, к. фарм. н. С 2020 года ректором вуза является В. Г. Лужанин.

В ПГФА активно работает диссертационный совет. В состав совета на данный момент входят 25 человек: 23 доктора наук (18 фармацевтических, 2 химических, 1 биологических и 2 медицинских наук); 2 кандидата наук (1 биологических наук, 1 фармацевтических наук). В диссертационном совете происходят защиты диссертаций ученых практически из всех регионов Российской Федерации, а также граждане таких стран как Сирия и Таджикистан. В Академии работают 4 научные школы: Совершенствование лекарственного обеспечения населения и медицинских организаций учреждений (лидер школы – А. В. Солонина), Синтез, строение, свойства и биологическая активность гетероциклических соединений, полученных на основе оксалильных производных метилкетонов и циклогександикарбоновых кислот (лидер школы В. Л. Гейн); Разработка методик определения лекарственных, наркотических, психотропных веществ и их метаболитов для целей фармацевтического, хи-

<sup>1</sup> Юбилейные альбомы кафедр Пермского фармацевтического института. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.pfa.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880&Itemid=866](https://www.pfa.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=880&Itemid=866). Ссылка активна на 20.10.2022.

мико-токсикологического анализа, фармакокинетических исследований и эколого-фармацевтического мониторинга (лидер школы: Т.Л. Малкова); Ресурсы, рациональное использование, экология, биология, химический состав и интродукция дикорастущих лекарственных растений (лидер школы: В.Д. Белогова).

Благодаря усилиям ректора ПГФА В.Г. Лужанина был создан факультет промышленной фармации, его торжественное открытие состоялось 19.05.2022 г. в присутствии преподавателей академии, представителей краевой и городской власти и представителей фармацевтического бизнеса. Факультет объединил обучающихся по направлениям подготовки: 19.03.01 «Биотехнология» и 18.03.01 «Химическая технология». Подготовка специалистов для промышленной фармации осуществляется по аккредитованным программам в сотрудничестве с Пермскими фармацевтическими компаниями (НПО «Биомед» и «Медисорб»).

Большое значение для жизни вуза имеет воспитательная работа со студентами. С первых дней своего существования вуз формировал спортивные секции, организовывал культурно массовые мероприятия. Даже в суровые дни войны в МФИ работали хоровой кружок, оркестр народных инструментов, студенты участвовали в спортивных соревнованиях как уровня вуза, так и городского масштаба, таких как эстафета на приз газеты «Звезда». В 1960 годы легкоатлетическая команда ПФИ побеждала на областных соревнованиях, существовала гимнастическая секция, студенты и преподаватели ПФИ ходили в походы вместе со студентами медицинского института. В 1967 году создается баскетбольная команда института (тренер В.И. Козадаев). В 70 работали легкоатлетическая секция, лыжная, команда стрелков. Начиная с 1968/1969 года женская баскетбольная команда неизменно завоевывала первые места в соревнованиях на звание чемпиона города, области, спартакиад города и области, а с 1969 года успешно выступала в соревнованиях республиканского и союзного масштаба. В 1967 году был открыт первый палаточный спортивный лагерь для студентов ПФИ в с. Ильинское на 59 мест. В 1973 году был построен спортивный лагерь «Провизор», сначала на 40 человек, а затем число мест увеличилось до 120. За период 60-е годы – начало девяностых в лагере отдохнуло более 4000 студентов. В 60 годах работал хор, танцевальный ансамбль. В 1970 годы – хор, танцевальный ансамбль, в 70 – создается ансамбль баянистов, вокальный ансамбль «Алена», самый известный и популярный среди студентов и жителей городов ВИА «Виола». Студенты ежегодно участвуют в театральные веснах города Перми с 1957 года. Важной вехой в истории студенческой жизни нескольких поколений студентов нашего вуза было создание строительных отрядов. Первые отряды были направлены

на освоение целины, свои воспоминания об этих годах записали: В.И. Панцуркин, М.А. Чиркова, А.Е. Решетиллов, Л.В. Сухих. С 1963 года появились стройотряды, которые работали не только в строительной сфере. На базе ПФИ были сформированы такие отряды как Магистраль и Уралочка (отряды проводников), Арника и Парма работали в сельском хозяйстве, Формика, Целинник и Строитель (в области строительства), Амика (торговый отряд)<sup>1</sup>. На постоянной основе, бесплатно для студентов в академии всегда работали коллективы художественной самодеятельности: вокальный, танцевальный. Традиционными в академии стали такие мероприятия, как: посвящение в студенты, вечер выпускников, межвузовские праздники («Мисс Фармация»). Итогом работы всех коллективов художественной самодеятельности является межвузовский фестиваль «Студенческая концертно-театральная весна». Праздничные мероприятия различной тематики проводится общегитити № 1, в которых активно участвуют иностранные студенты. Благодаря усилиям кафедры физического воспитания в ПГФА активно развивается туризм, подготовлены футбольные команды. В 2019 году команда по черлидингу достойно выступила на чемпионате мира в США. Студенты активно участвуют в легкоатлетических кроссах.

Основой для формирования научных исследований, работы в научно-педагогической деятельности сотрудников вуза, обеспечении учебными и методическими материалами студентов вуза является самоотверженная работа библиотеки ПГФА. Гордостью вуза является «Редкий книжный фонд» библиотеки, включающий две тысяч изданий на русском, английском, немецком, французском языках с конца XVIII века по 20-е годы XX века. В годы войны библиотека собирала и отправляла на освобожденные территории страны книги для местных библиотек, в настоящее время она является организатором множество мероприятий воспитательного и культурно-образовательных направлений. Слаженная работа руководителей и сотрудников вуза создает преемственность в учебной и научной работе, высвечивает ценности, рождает идеи для работы, в конечном итоге создает фармацевтических специалистов высокого уровня.

Проведен анализ деятельности Пермской государственной фармацевтической академии. Собран и проанализирован большой фактографический материал по таким разделам, как: руководство вузом, развитие материально-технической базы, формы обучения студентов, направления научных исследований, воспитательная работа студентов и другие.

<sup>1</sup> Воспоминания участников строительных отрядов. Архив музея ПГФА. Доступно по: [https://www.rea.ru/ru/org/affiliates/studovet/Pages/history\\_SO.aspx](https://www.rea.ru/ru/org/affiliates/studovet/Pages/history_SO.aspx). Ссылка активна на 20.10.2022.

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. компании, 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 неготовность 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 гAAV. 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 отлаженных 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 офлайн-участников, 4500 человек присоединились к площадкам онлайн. На мероприятии работали специалисты из 55 регионов России и 14 стран мира.



Оригинальная статья / Research article

## Антигипоксическая активность 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-онов

С. С. Зыкова<sup>1</sup>✉, К. В. Намятова<sup>1</sup>, К. Л. Ганькова<sup>1</sup>, Е. А. Лысцова<sup>2</sup>, Т. В. Шаврина<sup>2</sup>, С. Н. Шуров<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> ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), 614990, Россия, Пермь, ул. Букирева, д. 15

✉ Контактное лицо: Зыкова Светлана Сергеевна. E-mail: [zykova.sv@rambler.ru](mailto:zykova.sv@rambler.ru)

ORCID: С. С. Зыкова – <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>; К. В. Намятова – <https://orcid.org/0000-0001-7529-9746>; К. Л. Ганькова – <https://orcid.org/0000-0002-7605-6129>; Е. А. Лысцова – <https://orcid.org/0000-0003-0453-0589>; Т. В. Шаврина – <https://orcid.org/0000-0001-8734-8621>; С. Н. Шуров – <https://orcid.org/0000-0002-6293-9246>.

Статья поступила: 07.10.2022      Статья принята в печать: 09.11.2022      Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Состояние гипоксии, вызывая повреждение и гибель клеток, лежит в основе многих патологических процессов. Кроме того, гипоксия индуцирует состояние свободно-радикального окисления, что усиливает повреждающее действие гипоксийного повреждения. Это обуславливает необходимость синтеза новых соединений и создание на их основе лекарственных средств, обладающих антигипоксической активностью.

**Цель.** Целью данного исследования является синтез и исследование антигипоксической активности 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-онов.

**Материалы и методы.** Соединения ряда 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-онов были получены в результате взаимодействия 2-арил-7,7-диметил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидрохинолин-4-карбоновых кислот с *o*-толил-, *p*-толил-, *p*-фтор-, *p*-нитро-, 2,4,6-трихлор-фенилгидразинами. В результате было синтезировано 10 веществ, структура которых была подтверждена данными ИК- и <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии. Изучение антигипоксической активности полученных соединений проводилось на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией («баночной» гипоксии).

**Результаты и обсуждение.** Изученные соединения неодинаково влияют на продолжительность жизни мышей в условиях острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией. Наиболее значимо увеличивали продолжительность жизни мышей на 26,36 % и 25,64 % соединения IIII и IIIId соответственно, менее значительно – соединения IIIa, IIIb, IIIg, не влияли – соединения IIIc и IIIf, а соединение IIIj оказало прогипоксическое действие.

**Заключение.** Выявлены соединения с антигипоксической активностью. Таким образом, дальнейшие синтез и изучение 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-онов целесообразны.

**Ключевые слова:** 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-оны, антигипоксическая активность, трициклические гетероциклы, нормобарическая гипоксия, гиперкапния.

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

**Вклад авторов.** Е. А. Лысцова, Т. В. Шаврина, К. В. Намятова, С. Н. Шуров синтезировали соединения. С. С. Зыкова, К. В. Намятова, К. Л. Ганькова провели исследование активности соединений. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Соответствие принципам этики.** Исследования проведены с разрешения Этической комиссии по биоэтике ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России от 22.12.2021 протокол № 2.

**Для цитирования:** Зыкова С. С., Намятова К. В., Ганькова К. Л., Лысцова Е. А., Шаврина Т. В., Шуров С. Н. Антигипоксическая активность 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-онов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):22–26. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-22-26](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-22-26)

## Antihypoxic Activity of 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]quinnolin-3-ones

Svetlana S. Zykova<sup>1</sup>✉, Kristina V. Namyatova<sup>1</sup>, Kseniya L. Gankova<sup>1</sup>, Ekaterina A. Lystsova<sup>2</sup>, Tatiana V. Shavrina<sup>2</sup>, Sergey N. Shurov<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, Poleyeva str., Perm, 614990, Russia

<sup>2</sup> Perm State University (PSU), 15, Bukireva str., Perm, 614990, Russia

✉ Corresponding author: Svetlana S. Zykova. E-mail: [zykova.sv@rambler.ru](mailto:zykova.sv@rambler.ru)

ORCID: Svetlana S. Zykova – <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>; Kristina V. Namyatova – <https://orcid.org/0000-0001-7529-9746>; Kseniya L. Gankova – <https://orcid.org/0000-0002-7605-6129>; Ekaterina A. Lystsova – <https://orcid.org/0000-0003-0453-0589>; Tatiana V. Shavrina – <https://orcid.org/0000-0001-8734-8621>; Sergey N. Shurov – <https://orcid.org/0000-0002-6293-9246>.

Received: 07.10.2022      Revised: 09.11.2022      Published: 27.12.2022

© Зыкова С. С., Намятова К. В., Ганькова К. Л., Лысцова Е. А., Шаврина Т. В., Шуров С. Н., 2022

© Zykova S. S., Namyatova K. V., Gankova K. L., Lystsova E. A., Shavrina T. V., Shurov S. N., 2022

## Abstract

**Introduction.** The state of hypoxia, causing damage and cell death, underlies many pathological processes. In addition, hypoxia induces a state of free radical oxidation, which enhances the damaging effect of hypoxic damage. This necessitates the synthesis of new compounds and the creation on their basis of drugs with antihypoxic activity.

**Aim.** The aim of this study is the synthesis and study of the antihypoxic activity of 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]quinolin-3-ones.

**Materials and methods.** Compounds of the 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]quinolin-3-ones series were obtained as a result of the interaction of 2-aryl-7,7-dimethyl-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-4-carboxylic acids с *o*-tolyl-, *p*-tolyl-, *p*-fluoro-, *p*-nitro-, 2,4,6-trichlorophenylhydrazines. As a result, 10 substances were synthesized, the structure of which was confirmed by IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The study of the antihypoxic activity of the obtained compounds was carried out using the method of normobaric hypoxia with hypercapnia («hypoxia in a jar»).

**Results and discussion.** The studied compounds have different effects on the lifespan of mice under conditions of acute normobaric hypoxia with hypercapnia. Compounds IIIi and IIId, respectively, increased the lifespan of mice most significantly by 26.36 % and 25.64 %, respectively, compounds IIIa, IIIb, IIIg were less significant, compounds IIIc and IIIf had no effect, and compound IIIj had a prohypoxic effect.

**Conclusion.** Compounds with the most pronounced antihypoxic and antioxidant properties have been identified. Thus, further synthesis and study of 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]quinolin-3-ones is reasonable.

**Keywords:** antioxidants, hypoxia, oxidative stress, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, chemistry techniques, synthetic.

**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 A. Lystsova, Tatiana V. Shavrina, Sergey N. Shurov synthesized compounds. Svetlana S. Zykova, Kristina V. Namyatova, Kseniya L. Gankova conducted a study of the activity of the compounds. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**Compliance with the principles of ethics.** The studies were carried out with the permission of the Ethical Commission on Bioethics of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the PSFA of the Ministry of Health of Russia dated December 22, 2021 protocol No. 2.

**For citation:** Zykova S. S., Namyatova K. V., Gankova K. L., Lystsova E. A., Shavrina T. V., Shurov S. N. Antihypoxic activity of 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]quinolin-3-ones. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):22–26. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-22-26](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-22-26)

## ВВЕДЕНИЕ

Гипоксия, возникающая в результате острых состояний, представляет собой патологический процесс, результатом которого является повреждение и гибель клеток. Наиболее подверженными гипоксическому повреждению являются клетки мозга [1], клетки поджелудочной железы [2], кардиомиоциты [3].

Острая гипоксия приводит к гипоксическому повреждению. Периодически возникающая гипоксия запускает механизмы адаптации, способствует формированию компенсаторных механизмов. Далее при восстановлении нормального кровообращения в ишемизированных тканях возникает явление реперфузии, которое сопровождается гиперпродукцией свободных радикалов, повреждающих мембраны клеток мозга, печени, сердца, поджелудочной железы [4, 5].

В ситуации реперфузии роль антиоксидантов заключается в связывании радикалов. Такие соединения называют «scavengers» от англ. — «сборщиками» радикалов [6]. В современной фармакокоррекции гипоксических состояний антиоксиданты занимают значительное место: мексидол [7], янтарная кислота [7], кокарбоксилаза [8], и др. Это обуславливает необходимость создания новых соединений, обладающих антиоксидантной активностью. Поиск соединений, обладающих антиоксидантной активностью

в ряду трициклических гетероциклов является актуальным [9].

Как правило, антигипоксическая активность связана с антиоксидантной активностью, поскольку гипоксия индуцирует развитие окислительного стресса [10, 11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Синтетическая часть

Изученные 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]хиннолин-3-оны (IIIa-j) были получены в результате взаимодействия 2-арил-7,7-диметил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидрохинолин-4-карбоновых кислот (Ia-d) [12] с *o*-толил-(IIa), *n*-толил-(IIb), *n*-фтор-(IIc), *n*-нитро-(IId), 2,4,6-трихлор-(IIe) фенилгидразинами (рисунок 1).

Пиридоциннолины (IIIa-j) представляют собой бесцветные или слабоокрашенные кристаллические вещества, растворимые в ДМФА и ДМСО. Выходы и температуры плавления 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]циннолин-3-онов (IIIa-j) приведены в таблице 1.

Строение синтезированных соединений подтверждено данными ИК- и <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии. Так в ИК-спектрах пиридоциннолинов IIIa-j наиболее

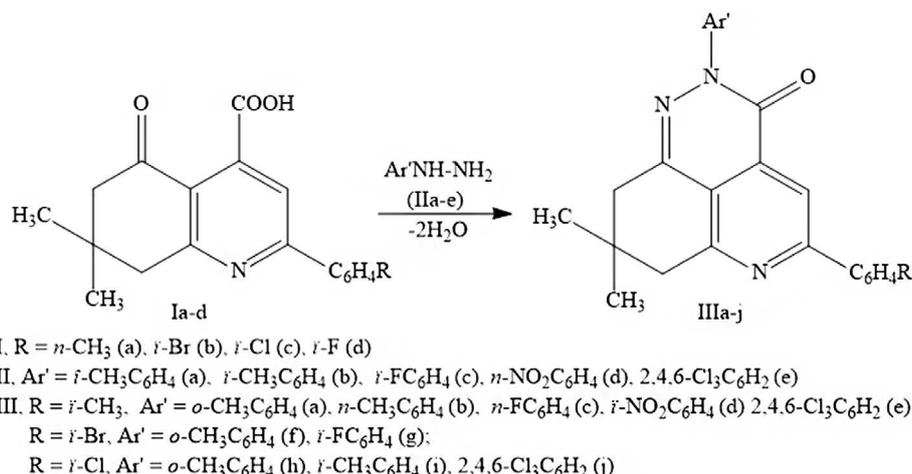


Рисунок 1. Схема синтеза 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]циннолин-3-онов

Figure 1. Scheme for the synthesis of 2,5-diaryl-8,8-dimethyl-3,6,7,8-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]cinnolin-3-ones

характеристичной является полоса валентных колебаний связи C=O в области 1660–1680 см<sup>-1</sup>. В спектрах <sup>1</sup>H ЯМР наряду с сигналами протонов ароматических колец и метильных групп в соединениях IIIa, b, f, h, l присутствуют синглеты 6 протонов двух метильных групп при C<sup>8</sup> (1,10–1,12 м.д.), метиленовых групп C<sup>9</sup>H<sub>2</sub> (2,78–2,81 м.д.), C<sup>7</sup>H<sub>2</sub> (3,08–3,10 м.д.) и винильного протона C<sup>4</sup>H (8,37–8,44) м.д. Указанные спектральные характеристики соответствуют ранее опубликованным данным для структурно близких соединений [13].

Таблица 1. Выходы, температуры плавления соединений IIIa-j

Table 1. Yields, melting points of compounds IIIa-j

Соединение Compound	R	Ar'	Выход, % Product exit, %	T <sub>melt.</sub> , °C
IIIa	<i>n</i> -CH <sub>3</sub>	<i>o</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	50	162–163
IIIb	<i>n</i> -CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	58	200–201
IIIc	<i>n</i> -CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	48	209–210
III d	<i>n</i> -CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	89	269–270
III e	<i>n</i> -CH <sub>3</sub>	2,4,6-Cl <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	91	156–157
III f	<i>n</i> -Br	<i>o</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	60	217–218
III g	<i>n</i> -Br	<i>n</i> -FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	61	247–248
III h	<i>n</i> -Cl	<i>o</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	54	204–205
III i	<i>n</i> -Cl	<i>n</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	60	232–233
III j	<i>n</i> -Cl	2,4,6-Cl <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	92	184–185

### Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры записаны на фурье-спектрометре Spectrum Two (PerkinElmer, США) в вазелиновом масле. Спектры <sup>1</sup>H ЯМР сняты на спектрометре Bruker Avance IIIHD в ДМСO-d<sub>6</sub>, рабочая частота 400 МГц (внутренний стандарт – остаточный сигнал от дей-

терорастворителя). Элементный анализ проводили на приборе LECO CHNS-932 (LECO, США). Температуры плавления определяли на приборе SMP40 (Bibby Scientific, Великобритания).

Общая методика синтеза 2,5-дизамещенных 8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]циннолин-3-онов. Смесь 0,005 моль замещенного гидразина и 0,003 моля 2-арил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидрохинолин-4-карбоновой кислоты в 20 мл этанола кипятили в течение 1,5 ч. После охлаждения реакцию отфильтровали и перекристаллизовали из подходящего растворителя.

### Экспериментальная фармакологическая часть

Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией изучалась на 75 белых беспородных мышах-самцах, находящихся на стандартном рационе вивария, массой 18,0–22,0 г с разрешения этического комитета ПФФА. В каждую группу брали 5–6 мышей. Изучено 8 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]циннолин-3-онов, отличающихся природой заместителей у атомов азота N<sup>2</sup> и углерода C<sup>5</sup>.

Исследуемые соединения в виде суспензии вводили однократно внутривенно в дозе 50 мг/кг за 30 минут до помещения животного в модельные условия. Препаратами сравнения были выбраны янтарная кислота (ч.д.а., серия 44, дата производства 10.10.18) и этилметил-6-пиридоксин сулфат (Мексидол®, сер. 1661221, годен до 01.25). Контролем выступает группа животных, которым вводили только растворитель – 2 % раствор крахмала.

Гипоксию моделировали, помещая животных в камеры из прозрачного стекла одинаковой формы с герметично закрывающимися крышками объемом 250 мл. Отсчет времени проводили с момента герме-

тизации банок. Антигипоксический эффект оценивали по продолжительности жизни мышей в сравнении с контролем [14]. Регистрировали продолжительность жизни в минутах [15].

Полученные данные обрабатывали с помощью пакета GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software Inc., США) с подсчетом t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Данные считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные соединения неодинаково влияют на продолжительность жизни мышей в условиях острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией (таблица 2).

**Таблица 2.** Влияние соединений на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией

**Table 2.** The effect of compounds on the lifespan of mice under conditions of acute hypoxia with hypercapnia

№	Соединения Compounds	Продолжительность жизни мышей (мин) Life span of mice (min)	Время жизни, % к контролю Lifetime, % to control
1	IIIa	33,50 ± 1,12	6,91
2	IIIb	37,00 ± 1,87	20,92*
3	IIIc	28,40 ± 2,17	-1,39
4	III d	36,75 ± 2,28	25,64
5	III f	30,50 ± 0,87	-0,33
6	III g	32,25 ± 1,78	10,26
7	III i	38,67 ± 1,70	26,36*
8	III j	26,50 ± 1,50	-7,02
9.	Янтарная кислота Succinic acid	49,27 ± 1,18	68,43
10.	Мексидол® Mexidol®	22,23 ± 0,85	10,51

**Примечание.** \* Соответствует  $p < 0,05$ .

**Note.** \* Corresponds to  $p < 0.05$ .

Наиболее значимо увеличивали продолжительность жизни мышей на 26,36 и 25,64 % в условиях острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией соединения III i и III d, соответственно. Менее значительно увеличивали продолжительность жизни мышей соединения III a, III b, III g, не влияли – соединения III c и III f, а соединение III j оказало прогипоксическое действие.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам проведенных экспериментов обнаружены вещества, обладающие выраженной антигипоксической активностью – III i и

III d. По этой причине целесообразны дальнейшие синтез и изучение 2,5-диарил-8,8-диметил-3,6,7,8-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]циннолин-3-онов как потенциально перспективных антигипоксантов и антиоксидантов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Godoy D. A., Lubillo S., Rabinstein A. A. Pathophysiology and Management of Intracranial Hypertension and Tissue Brain Hypoxia After Severe Traumatic Brain Injury: An Integrative Approach. *Neurosurgery Clinics of North America*. 2018;29(2):195–212. DOI: 10.1016/j.nec.2017.12.001.
- Morioka F., Tani N., Ikeda T., Hirokawa T., Ikeda K., Shida A., Aoki Y., Ishikawa T. Morphological and biochemical changes in the pancreas associated with acute systemic hypoxia. *Human Cell*. 2021;34(2):400–418. DOI: 10.1007/s13577-020-00481-0.
- Zhao R.-Z., Jiang S., Ru N.-Y., Jiao B., Yu Z.-B. Comparison of hypoxic effects induced by chemical and physical hypoxia on cardiomyocytes. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*. 2019;97(10):980–988. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0092.
- Sánchez-Hernández C. D., Torres-Alarcón L. A., González-Cortés A., Peón A. N. Ischemia/Reperfusion Injury: Pathophysiology, Current Clinical Management, and Potential Preventive Approaches. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020:1–13. DOI: 10.1155/2020/8405370.
- Yan H.-F., Tuo Q.-Z., Yin Q.-Z., Lei P. The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zoological Research*. 2020;41(3):220–230. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.042.
- Rodrigo R., Retamal C., Schupper D., Vergara-Hernández D., Saha S., Profumo E., Buttari B., Saso L. Antioxidant Cardioprotection against Reperfusion Injury: Potential Therapeutic Roles of Resveratrol and Quercetin. *Molecules*. 2022;27(8):2564. DOI: 10.3390/molecules27082564.
- Шулькин А. В. Современные представления об антигипоксическом и антиоксидантном эффектах мексидола. *Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова*. 2018;118(12):87–93. DOI: 10.17116/jnevro201811812287.
- Ozer M., Ince S., Gundogdu B., Aktas M., Uzel K., Gursul C., Suleyman H., Suleyman Z. Effect of thiamine pyrophosphate on cyclophosphamide-induced oxidative ovarian damage and reproductive dysfunction in female rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2022;31(2):129–137. DOI: 10.17219/acem/142535.
- Руденко Д. А., Шаврина Т. В., Шуров С. Н., Зыкова С. С. Синтез и антиоксидантная активность трициклических соединений, содержащих 5,6,7,8-тетрагидрохинолин-новый фрагмент. *Химико-фармацевтический журнал*. 2014;48(2):32–35. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-2-32-35.
- Forman H. J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(9):689–709. DOI: 10.1038/s41573-021-00233-1.
- Trüeb R. M. Oxidative stress and its impact on skin, scalp and hair. *International Journal of Cosmetic Science*. 2021;43(51):9–13. DOI: 10.1111/ics.12736.
- Руденко Д. А., Шуров С. Н., Кодесс М. И., Ежикова М. А., Васянин А. Н. Синтез 2-замещенных 7,7-диметил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидрохинолин-4-карбоновых кислот. *Журнал органической химии*. 2012;48(6):799–803. DOI: 10.1134/S1070428012060097.
- Руденко Д. А., Шуров С. Н., Вахрин М. И., Карманов В. И., Шуров Ю. А. Взаимодействие 2-замещенных 7,7-диметил-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидрохинолин-4-карбоновых кислот с гидразином. Синтез 5-замещенных 8,8-диметил-3,7,8,9-тетрагидро-2H-пиридо[4,3,2-de]циннолин-3-онов. *Химия гетероциклических соединений*. 2012;10:1634–1639.
- Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств. М.: Гриф; 2012. 440 с.
- Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств. М.: Гриф; 2012. 285 с.

## REFERENCES

1. Godoy D. A., Lubillo S., Rabinstein A.A. Pathophysiology and Management of Intracranial Hypertension and Tissue Brain Hypoxia After Severe Traumatic Brain Injury: An Integrative Approach. *Neurosurgery Clinics of North America*. 2018;29(2):195–212. DOI: 10.1016/j.nec.2017.12.001.
2. Morioka F., Tani N., Ikeda T., Hirokawa T., Ikeda K., Shida A., Aoki Y., Ishikawa T. Morphological and biochemical changes in the pancreas associated with acute systemic hypoxia. *Human Cell*. 2021;34(2):400–418. DOI: 10.1007/s13577-020-00481-0.
3. Zhao R.-Z., Jiang S., Ru N.-Y., Jiao B., Yu Z.-B. Comparison of hypoxic effects induced by chemical and physical hypoxia on cardiomyocytes. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*. 2019;97(10):980–988. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0092.
4. Sánchez-Hernández C. D., Torres-Alarcón L. A., González-Cortés A., Peón A.N. Ischemia/Reperfusion Injury: Pathophysiology, Current Clinical Management, and Potential Preventive Approaches. *Mediators of inflammation*. 2020;2020:1-13. DOI: 10.1155/2020/8405370.
5. Yan H.-F., Tuo Q.-Z., Yin Q.-Z., Lei P. The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zoological research*. 2020;41(3):220–230. DOI: 10.24272/zj.issn.2095-8137.2020.042.
6. Rodrigo R., Retamal C., Schupper D., Vergara-Hernández D., Saha S., Profumo E., Buttari B., Saso L. Antioxidant Cardioprotection against Reperfusion Injury: Potential Therapeutic Roles of Resveratrol and Quercetin. *Molecules*. 2022;27(8):2564. DOI: 10.3390/molecules27082564.
7. Shchulkin A.V. A modern concept of antihypoxic and antioxidant effects of mexidol. *S.S.Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2018;118(12):87–93. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro201811812287.
8. Ozer M., Ince S., Gundogdu B., Aktas M., Uzel K., Gursul C., Suleyman H., Suleyman Z. Effect of thiamine pyrophosphate on cyclophosphamide-induced oxidative ovarian damage and reproductive dysfunction in female rats. *Advances in clinical and experimental medicine*. 2022;31(2):129–137. DOI: 10.17219/acem/142535.
9. Rudenko D. A., Shavrina T. V., Shurov S. N., Zykova S. S. Synthesis and antioxidant activity of tricyclic compounds containing 5,6,7,8-tetrahydroquinoline fragment. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2014;48(2):32–35. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-2-32-35.
10. Forman H.J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(9):689–709. DOI: 10.1038/s41573-021-00233-1.
11. Trüeb R.M. Oxidative stress and its impact on skin, scalp and hair. *International journal of cosmetic science*. 2021;43(S1):9–13. DOI: 10.1111/ics.12736.
12. Rudenko D. A., Shurov S. N., Kodess M. I., Ezhikova M. A., Vasyanin A. N. Synthesis of 2-substituted 7,7-dimethyl-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-4-carboxylic acids. *Journal of Organic Chemistry*. 2012;48(6):799–803. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1070428012060097.
13. Rudenko D. A., Shurov S. N., Vakhnin M. I., Karmanov V. I., Shchurov Yu. A. Interaction of 2-substituted 7,7-dimethyl-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-4-carboxylic acids with hydrazine. Synthesis of 5-substituted 8,8-dimethyl-3,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrido[4,3,2-de]cinnolin-3-ones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2012;10:1634–1639. (In Russ.)
14. Mironov A.N., Bunatyan N.D. Guidelines for preclinical drug testing. Moscow: Grif; 2012. 440 p. (In Russ.)
15. Mironov A.N., Bunatyan N.D. Guidelines for preclinical drug testing. Moscow: Grif; 2012. 285 p. (In Russ.)

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-27-30](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-27-30)  
УДК 615.31



Оригинальная статья / Research article

## Исследование антиоксидантной активности и квантово-химические расчеты 2-аминопирролов

С. С. Зыкова<sup>1</sup>✉, К. Л. Ганькова<sup>1</sup>, М. В. Шустов<sup>1</sup>, Н. М. Игидов<sup>1</sup>, С. С. Борисевич<sup>2</sup>, М. Г. Ильина<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> ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (Уфимский Институт химии УФИЦ РАН), 450054, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, пр-т. Октября, д. 71

✉ Контактное лицо: Зыкова Светлана Сергеевна. E-mail: zykova.sv@rambler.ru

ORCID: С. С. Зыкова – <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>; К. Л. Ганькова – <https://orcid.org/0000-0002-7605-6129>; М. В. Шустов – <https://orcid.org/0000-0002-3379-3065>; Н. М. Игидов – <https://orcid.org/0000-0003-0976-9951>; С. С. Борисевич – <https://orcid.org/0000-0001-8481-0470>; М. Г. Ильина – <https://orcid.org/0000-0002-5552-9353>.

Статья поступила: 07.10.2022

Статья принята в печать: 23.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Современная терапия констатирует окислительный стресс как одно из ключевых звеньев патогенеза целого ряда заболеваний, что делает поиск новых низкомолекулярных антиоксидантов актуальным [1]. Распространенные методики несовершенны, поскольку отражают реакционную способность пробы в искусственных условиях [2–4]. Предлагаемая методика применения биосенсора «Эколюм» позволяет сохранить преимущества *in vitro* методик и повысить точность определения путем использования биологических реакций клеток [5, 6].

**Цель.** Исследование антирадикальной и антиоксидантной активности 2-аминопирролов с применением методик *in vitro*, квантово-химических расчетов.

**Материалы и методы.** Ранее получены производные 2-аминопирролов. Исследование антирадикальной активности соединений осуществлялось с помощью тестаДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил). Антиоксидантная активность оценивалась на модели окислительного стресса с использованием биосенсора «Эколюм». Квантово-химические расчеты для оценки электронных параметров молекул проводились в газовой фазе.

**Результаты и обсуждение.** Данные теста антиоксидантной активности свидетельствуют о более выраженном антиокислительном потенциале вещества 2a, поскольку его применение вызвало значительное снижение уровня стресса клеточной культуры по сравнению с веществом 2b. Тестирование антирадикальной активности соединений выявило больший антирадикальный потенциал вещества 2b, что раскрывает тезис авторов об ограниченности распространенных методик исследования антиоксидантов. Квантово-химические расчеты показали, что соединение 2b характеризуется более высоким значением потенциала ионизации, что может свидетельствовать о его большей стойкости к окислению, по сравнению с 2a.

**Заключение.** Исследование антирадикальной и антиоксидантной активности 2-аминопирролов показало актуальность разработки методики для поиска новых антиоксидантов, поскольку тест антирадикальной активности не отразил воздействие 2-аминопирролов на культуру биосенсора. Применение квантово-химических расчетов позволило оценить реакционную способность исследуемых соединений.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, культура клеток, компьютерная симуляция, *Escherichia coli*, окислительный стресс, DFT-расчеты

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

**Вклад авторов.** Н. М. Игидов, К. Л. Ганькова синтезировали соединения. С. С. Зыкова, М. В. Шустов проводили исследование активности соединений *in vitro*, С. С. Борисевич, М. Г. Ильина проводили квантово-химические расчеты.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Зыкова С. С., Ганькова К. Л., Шустов М. В., Игидов Н. М., Борисевич С. С., Ильина М. Г. Исследование антиоксидантной активности и квантово-химические расчеты 2-аминопирролов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):27–30. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-27-30](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-27-30)

## Study of Antioxidant Activity and Quantum-chemical Calculations of 2-aminopyrroles

Svetlana S. Zykova<sup>1</sup>✉, Kseniya L. Gankova<sup>1</sup>, Maxim V. Shustov<sup>1</sup>, Nazim M. Igidov<sup>1</sup>, Sophia S. Borisevich<sup>2</sup>, Margarita G. Ilyina<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> Ufa Institute of Chemistry, Ural Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71, Oktyabrya ave., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450054, Russia

✉ Corresponding author: Svetlana S. Zykova. E-mail: zykova.sv@rambler.ru

ORCID: Svetlana S. Zykova – <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>; Kseniya L. Gankova – <https://orcid.org/0000-0002-7605-6129>; Maxim V. Shustov – <https://orcid.org/0000-0002-3379-3065>; Nazim M. Igidov – <https://orcid.org/0000-0003-0976-9951>; Sophia S. Borisevich – <https://orcid.org/0000-0001-8481-0470>; Margarita G. Ilyina – <https://orcid.org/0000-0002-5552-9353>.

Received: 07.10.2022

Revised: 23.11.2022

Published: 27.12.2022

© Зыкова С. С., Ганькова К. Л., Шустов М. В., Игидов Н. М., Борисевич С. С., Ильина М. Г., 2022

© Zykova S. S., Gankova K. L., Shustov M. V., Igidov N. M., Borisevich S. S., Ilyina M. G., 2022

## Abstract

**Introduction.** Modern therapy defines oxidative stress as one of the key links in the pathogenesis of different diseases, which makes the search for new low molecular weight antioxidants actual [1]. The widely used methods are imperfect, since they reflect reactivity of the sample under artificial conditions [2–4]. The proposed technique of using the "Ecolum" biosensor makes it possible to preserve the advantages of *in vitro* methods and improve the accuracy of determination through the use of biological reactions of cells [5, 6].

**Aim.** Studying of the antiradical and antioxidant activity of 2-aminopyrroles, using *in vitro* methods and quantum-chemical calculations.

**Materials and methods.** Earlier, derivatives of 2-aminopyrroles were obtained. Antiradical activity of the compounds was studied using the DPPH test (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Antioxidant activity was evaluated on the model of oxidative stress using the «Ecolum» biosensor. The calculation data of the indices of reactivity in the approximation of the gas phase were obtained using quantum-chemical methods.

**Results and discussion.** The antioxidant activity test indicated a higher antioxidant potential of 2a, compared to 2b. Antiradical activity test revealed a greater antiradical potential of 2b. Quantum-chemical calculations showed that 2b is characterized by a higher ionization potential, which may indicate its greater resistance to oxidation compared to 2a.

**Conclusion.** The study of the antiradical and antioxidant activity of 2-aminopyrroles showed the importance of developing a methodology for the search for new antioxidants, because of antiradical activity test deviations, compared to living cell reactions.

**Keywords:** Antioxidants, Cells, Cultured, Computer Simulation, *Escherichia coli*, Oxidative Stress

**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.** Nazim M. Igidov, Kseniya L. Gankova synthesized compounds. Svetlana S. Zykova, Maxim V. Shustov studied the activity of compounds *in vitro*, Sophia S. Borisevich, Margarita G. Ilyina carried out quantum chemical calculations.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Zykova S. S., Gankova K. L., Shustov M. V., Igidov N. M., Borisevich S. S., Ilyina M. G. Study of antioxidant activity and quantum-chemical calculations of 2-aminopyrroles. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):27–30. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-27-30](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-27-30)

## ВВЕДЕНИЕ

Современная терапия констатирует окислительный стресс как одно из ключевых звеньев патогенеза целого ряда заболеваний, что делает поиск новых низкомолекулярных антиоксидантов актуальным [1]. Широко используемые методики определения антиоксидантной активности рассматривают оценку антиоксидантного потенциала на основе одной химической реакции, что позволяет ускорить процесс определения и эффективно сравнивать в рамках метода различные соединения, однако, фактически результат отражает лишь реакционную способность пробы в определенных, сугубо искусственных условиях [2–4]. Нами предложена методика применения биосенсора «Эколюм», представляющего собой культуру *E. coli*, обладающую биолюминесценцией, зависящей от токсического воздействия на биосенсор, при определении антиоксидантного потенциала соединений путем воздействия на культуру биосенсора исследуемого вещества и раствора перекиси водорода. Применение биосенсора позволяет сохранить преимущества *in vitro* методик и повысить точность определения за счет использования биологических реакций клеток, расширяя спектр изучаемых механизмов антиоксидантной активности [5, 6]. При разработке нового метода определения антиоксидантной активности *in vitro* использовались результаты ДФПГ-теста антирадикальной активности для определения сходимости с результатами классических *in vitro* тестов антиоксидантной активности, а также квантово-химические расчеты, позволяющие оценить реакционную способность соединений в биологических системах за счет определения физико-химических параметров мо-

лекулы. Исследование антиоксидантной и антирадикальной активности 2-аминопирролов дополняет актуальность исследования, поскольку позволяет раскрыть возможности перспективной группы веществ-цитостатиков, действие которых на опухолевую ткань может быть дополнено нарушением патологического баланса свободных форм кислорода [7–10].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

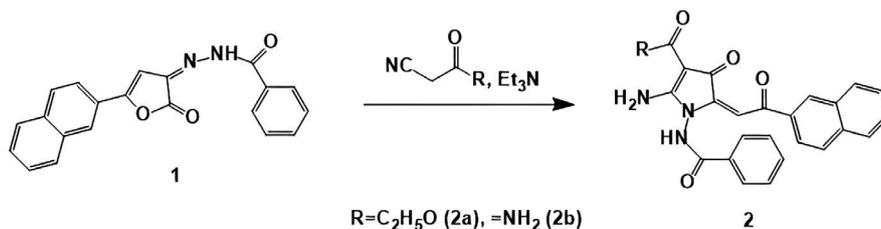
### Синтетическая часть

Для проведения данного исследования были получены производные 2-аминопирролов (рисунок 1).

К раствору 1,71 г (0,005 моль) N-[5-(нафталин-2-ил)-2-оксофуран-3 (2 H)-илиден]бензогидразида в 40 мл безводного толуола добавляли 0,56 г (0,005 моль) этилового эфира или 0,42 г (0,005 моль) амида циануксусной кислоты, и 0,5 г (0,005 моль) триэтиламина. Полученную смесь нагревали в течение 30–120 мин, затем охлаждали до 0 °С. Осадок отфильтровывали и перекристализовывали из этанола (2a), из метанола (2b).

### Фармакологическая часть

Антирадикальную активность исследовали с помощью метода связывания стабильного радикала 2,2-дифенилпикрил-1-гидразилом (ДФПГ или DPPH), связывание радикалов которого исследуемыми соединениями определяли по величине оптической плотности, которую устанавливали спектрофотометрически. Концентрация ДФПГ в 96%-м этаноле составляла  $6,5 \times 10^{-5}$  М. В кювету СФ-2000 объемом 3 мл добавляли смесь 10 мкл раствора исследуемого ве-



**Рисунок 1.** Общий путь синтеза производных 2-аминопирролов

**Figure 1.** General route for the synthesis of 2-aminopyrrole derivatives

щества в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мМ в 1 мл), 1 мл ТРИС-буферного раствора, 1 мл этанола 95 %. После измерения оптической плотности исследуемого вещества при длине волны 517 нм к смеси добавляли 1 мл раствора ДФПГ, перемешивали и выдерживали в темном прохладном месте в течение 30 минут, после чего проводили повторное измерение оптической плотности. Ингибирующий эффект рассчитывали по формуле:

$$Q = 100 (D_0 - D_x) / D_0 \quad (1)$$

где  $D_0$  – оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ;  $D_x$  – оптическая плотность раствора ДФПГ в присутствии исследуемого вещества либо раствора эталона сравнения за вычетом оптической плотности раствора, измеренной до добавления ДФПГ. В качестве эталона сравнения использовался тролокс (Trolox) – водорастворимая форма витамина E (Sigma-Aldrich, США).

Ингибирование флуоресцентной активности при окислительном стрессе биосенсора «Эколюм» в присутствии перекиси водорода проводилось с использованием ридера для микропланшет Synergy™ H1 (BioTek, США). В лунку 96-луночного планшета помещались 100 мкл. среды ГРМ № 3 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), 50 мкл. культуры клеток биосенсора «Эколюм», 25 мкл раствора исследуемого вещества в ДМСО (5 мг вещества растворялось в 1 мл ДМСО), либо контрольный объем ДМСО, а также 25 мкл 3 % раствора перекиси водорода. Определение флуоресценции проводили после экспозиции 40 мин при температуре 37 °C при длине волны возбуждения 490 нм и длине волны флуоресценции 585 нм. Определялось среднее значение трех повторностей, полученные значения использовались в формуле:

$$\text{ИФА} = (X_1 - X_2) / X_1 \times 100 \%, \quad (2)$$

где  $X_1$  – флуоресценция лунки контроля ДМСО;  $X_2$  – флуоресценция лунки с исследуемым веществом.

### Квантово-химическая часть

Все квантово-химические расчеты проводились на кластерном суперкомпьютере Уфимского института химии УФИЦ РАН. Использовали программное обеспечение Gaussian 16 rev., revision C.01, C.09 (Gaus-

sian Inc., США). Для оптимизации и решения колебательной задачи использовали метод M06-2X [11] с базисным набором cc-pVTZ [12]. Расчеты для определения электронных параметров исследуемых соединений проводили в приближении газовой фазы. Потенциал ионизации (IP) оценивался как разница в значениях энтальпий зарытой нейтральной (close-shell) и открытой (open-shell) оболочек атомно-молекулярных систем. Сродство к электрону (EA) похожим способом. Значение HOMO-LUMO gap оценивается как разница в значениях сродства к электрону и потенциала ионизации. Величина энергетического зазора используется для нахождения связи между электронной структурой и активностью молекул, а также характеризует их донорно-акцепторные и окислительно-восстановительные свойства. Значения IP и EA позволили оценить индексы реакционной способности молекул: «жесткость», «мягкость» и значения электроотрицательности и индекса электрофильности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Фармакологическая часть

Как видно из таблицы 1, вещества не оказали антиокислительного влияния, проявив цитотоксическое действие. Как видно из таблицы, вещества оказали умеренное антирадикальное действие.

**Таблица 1.** Результаты антиоксидантной и антирадикальной активности производных 2-аминопиррола

**Table 1.** Results of antioxidant and antiradical activity of 2-aminopyrrole derivatives

№	Соединения Compounds	Ингибирование флуоресцентной активности, % Fluorescent activity inhibition, %	Убыль радикалов, % Loss of radicals, %
1	2a	4,65	10,27
2	2b	15,09	15,84
3	Тролокс Trolox	-0,30	43,65

### Квантово-химическая часть

Геометрические параметры соединений 2a и 2b различаются природой заместителя. Вероятно, по этой причине практически все индексы реакционной способности молекул схожи (таблица 2). Замет-

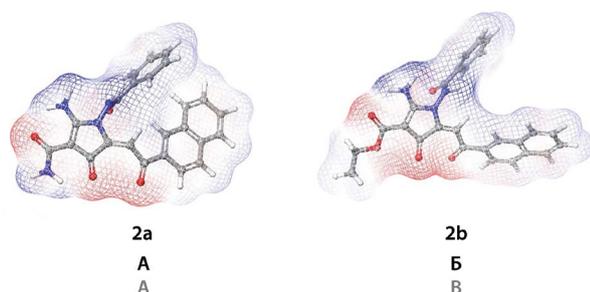
ные различия наблюдаются лишь в значениях потенциала ионизации. Большее значение IP характерно для 2b (на 0,22 эВ), что позволяет предположить большую стойкость к окислению.

**Таблица 2.** Рассчитанные значения электронных параметров изучаемых соединений

**Table 2.** Calculated values of the electronic parameters of the studied compounds

ID	IP, eV	EA, ev	H-L gap	$\eta$	S	$\chi$	$\omega$
2a	7,82	1,35	–,47	3,24	0,15	4,59	34,02
2b	8,04	1,49	–6,55	3,28	0,15	4,76	37,16

Молекулярный электростатический потенциал (MEP) [13] широко используется для предсказания нуклеофильных и электрофильных сайтов, а также молекулярного распознавания, поскольку молекулы всегда стремятся комплементарно сближаться друг с другом согласно величинам ESP (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Локальные минимумы (на рисунке отображены, синим цветом) и максимумы (на рисунке отображены красным цветом) электростатического потенциала (ESP) на Ван-дер-Ваальсовой поверхности для соединений 2a и 2b

**Figure 2.** Local minima (shown in blue in the figure) and maxima (shown in red in the figure) of the electrostatic potential (ESP) on the van der Waals surface for compounds 2a and 2b

Для соединения 2a минимум ESP составляет –78,69 ккал/моль, для соединения 2b – –87,45 ккал/моль. Что касается максимумов на поверхности Ван-дер-Ваальса, здесь для 2a составляет 81,32 ккал/моль, для 2b – 79,98 ккал/моль.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, исследуемые вещества 2a и 2b в тесте антиоксидантной активности с использованием биосенсора «Эколюм» показали наличие цитотоксического действия, выраженного в угнетении флуоресценции биосенсора по сравнению с веществом сравнения, однако, данные свидетельствуют о более выраженном антиокислительном потенциале вещества 2a, поскольку его применение вызвало трехкратное снижение уровня стресса клеточной культуры по сравнению с веществом 2b. Тестирование антирадикальной активности соединений выявило больший антирадикальный потенциал вещества 2b, что раскрывает тезис авторов о ограниченности распространенных методик исследования антиоксидантов. Согласно данным квантово-химических расчетов можно

предположить, что реакционная способность молекул 2a и 2b в целом схожая. Однако соединение 2b характеризуется более высоким значением потенциала ионизации, что может свидетельствовать об его большей стойкости к окислению, по сравнению с 2a.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование антирадикальной и антиоксидантной активности 2-аминопирролов *in vitro* показало актуальность разработки методики для поиска новых низкомолекулярных антиоксидантов, поскольку применение распространенных *in vitro* методик для скрининга не отразило воздействие 2-аминопирролов на уровне взаимодействия с живыми клетками, что свидетельствует о протекании иных процессов, обуславливающих антиоксидантный потенциал образцов. Квантово-химические расчеты показали возможную причину различной активности соединений.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Forman H. J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(9):689–709. DOI: 10.1038/s41573-021-00233-1.
2. Munteanu I. G., Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(7):3380. DOI: 10.3390/ijms22073380.
3. Nwachukwu I. D., Sarteshnizi R. A., Udenigwe C. C., Aluko R. E. A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*. 2021;26(16):4865. DOI: 10.3390/molecules26164865.
4. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 2020;94(3):651–715. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3.
5. Cruz R. G., Beney L., Gervais P., Lira S. P., Vieira T. M. F. S., Dupont S. Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. *Food Chemistr*. 2019;277:698–705. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.099.
6. Tzankova D., Vladimirova S., Aluani D., Yordanov Y., Peikova L., Georgieva M. Synthesis, in vitro safety and antioxidant activity of new pyrrole hydrazones. *Acta Pharmaceutica*. 2020;70(3):303–324. DOI: 10.2478/acph-2020-0026.
7. Boichuk S., Bikinieva F., Mustafin I., Galembikova A., Ryzkin S., Zykova S. 2-Amino-Pyrrole-Carboxylate Attenuates Homology-Mediated DNA Repair and Sensitizes Cancer Cells to Doxorubicin. *Biochemistry*. 2022;87(5):391–399. DOI: 10.1134/S0006297922050017.
8. Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K., Dunaev P., Bikinieva F., Aukhadieva A., Zykova S., Igidov N., Gankova K., Novikova M., Kopnin P. The Design, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrole-Based Carboxamides: The Novel Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine-Binding Site. *Molecules*. 2021;26(19):5780. DOI: 10.3390/molecules26195780.
9. Moloney J. N., Cotter T. G. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2018;80:50–64. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023
10. Harris I. S., DeNicola G. M. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends in Cell Biology*. 2020;30(6):440–451. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.03.002.
11. Zhao Y., Truhlar D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2008;120(1–3):215–241. DOI: 10.1007/s00214-007-0310-x.
12. Dunning T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of Chemical Physics*. 1989;90(2):1007–1023. DOI: 10.1063/1.456153.
13. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. MEP: a tool for interpretation and prediction. From molecular structure to solvation effects. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*. 1996;3:1–103. DOI: 10.1016/S1380-7323(96)80041-0.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-31-37](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-31-37)  
УДК 615.322:579.695:631.879.32



Оригинальная статья / Research article

## Фитостимулирующее действие продукта биодеструкции парацетамола на календулу лекарственную

Е. В. Вихарева<sup>1</sup>✉, И. И. Мишенина<sup>1</sup>, Е. Д. Гапечкина<sup>1</sup>, А. А. Селянинов<sup>2</sup>, М. И. Рычкова<sup>3</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> ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет» (ПНИПУ), 614990, г. Пермь, Комсомольский проспект, д. 29

<sup>3</sup> ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФИЦ УрО РАН), 614990, г. Пермь, ул. Ленина, зд.13А

✉ Контактное лицо: Вихарева Елена Владимировна. E-mail: [ajm@perm.ru](mailto:ajm@perm.ru)

ORCID: Е. В. Вихарева – <https://orcid.org/0000-0002-7202-0073>; И. И. Мишенина – <https://orcid.org/0000-0002-6496-7427>; Е. Д. Гапечкина – <https://orcid.org/0000-0002-4626-3143>;  
А. А. Селянинов – <https://orcid.org/0000-0001-8773-6894>; М. И. Рычкова – <https://orcid.org/0000-0002-6598-5870>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 17.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** В последние годы наблюдается нарастание фундаментального интереса к поиску эффективных, в том числе микробиологических, способов переработки фармацевтических отходов для получения на их основе новых биологически активных соединений. Полученные нами результаты показали, что продукт бактериальной деструкции парацетамола (ПБП) проявляет выраженные стимулирующие свойства в отношении лекарственных растений семейств *Plantaginaceae*, *Lamiaceae*, *Urticaceae*, *Linaceae* и может использоваться как индуктор накопления в них биологически активных веществ.

**Цель.** Цель настоящей работы – исследование влияния ПБП на динамику накопления биомассы и содержание флавоноидов в цветках календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), сем. Астровые (*Asteraceae*) в сравнении с контролем (водой) и стимулятором роста «Циркон».

**Материалы и методы.** В работе использовали ПБП, полученный на базе лаборатории алканотрофных микроорганизмов ФИЦ УрО РАН (Пермь). Цветки календулы лекарственной, собранные с растений, обработанных ПБП и стимулятором роста «Циркон», использовали для исследования динамики накопления сухой биомассы и изменения содержания флавоноидов спектрофотометрическим методом. Для сравнительного анализа интенсивности прироста биомассы цветков при обработке растений данными агентами, а также для прогноза накопления флавоноидов применили кинетическое моделирование.

**Результаты и обсуждение.** Общий сбор биомассы цветков календулы лекарственной при обработке растений ПБП увеличился на 55 %, а при обработке стимулятором роста «Циркон» – на 24 % по сравнению с контролем. Содержание флавоноидов в цветках при обработке данными агентами увеличилось на 101 и 40 % соответственно. Определены сроки начала сбора цветков календулы лекарственной в условиях Западного Урала: при использовании стимулятора роста «Циркон» – с 20 июля, ПБП – с 1 августа, без обработки стимуляторами роста – с 14 августа. Оба стимулятора увеличивают дату окончания сбора сырья на 10 суток.

**Заключение.** Продукт бактериальной деструкции парацетамола оказывает выраженное стимулирующее действие на календулу лекарственную (*Calendula officinalis* L.), существенно увеличивая биомассу цветков и содержание в них флавоноидов по сравнению с контролем (водой) и стимулятором роста «Циркон». С применением кинетического моделирования установлены значения параметров скорости роста биомассы растительного сырья при обработке растений данными агентами, осуществлен прогноз накопления флавоноидов и обоснованы сроки сбора цветков календулы лекарственной в условиях Западного Урала.

**Ключевые слова:** продукт биодеструкции парацетамола, фитостимуляция, календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.), флавоноиды, кинетическое моделирование

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

**Вклад авторов.** Е. В. Вихарева – планирование эксперимента, написание статьи. И. И. Мишенина, Е. Д. Гапечкина – проведение полевого эксперимента, обработка результатов. А. А. Селянинов – кинетическое моделирование. И. И. Рычкова – получение продукта биодеструкции парацетамола.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Вихарева Е. В., Мишенина И. И., Гапечкина Е. Д., Селянинов А. А., Рычкова М. И. Фитостимулирующее действие продукта биодеструкции парацетамола на календулу лекарственную. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):31–37. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-31-37](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-31-37)

## Phyto-stimulating Effect of Paracetamol Biodestruction Product on *Calendula Officinalis*

Elena V. Vihareva<sup>1</sup>✉, Irina I. Mishenina<sup>1</sup>, Elizaveta D. Gapechkina<sup>1</sup>, Alexander A. Selyaninov<sup>2</sup>, Marina I. Rychkova<sup>3</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, Poleyaya str., Perm, 614990, Russia

<sup>2</sup> Perm National Research Polytechnic University, 29, Komsomolsky av., Perm, 614990, Russia

<sup>3</sup> Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13A, Lenina str., Perm, 614990, Russia

✉ Corresponding author: Elena V. Vihareva. E-mail: [ajm@perm.ru](mailto:ajm@perm.ru)

© Вихарева Е. В., Мишенина И. И., Гапечкина Е. Д., Селянинов А. А., Рычкова М. И., 2022

© Vihareva E. V., Mishenina I. I., Gapechkina E. D., Selyaninov A. A., Rychkova M. I., 2022

ORCID: Elena V. Vihareva – <https://orcid.org/0000-0002-7202-0073>; Irina I. Mishenina – <https://orcid.org/0000-0002-6496-7427>;  
Elizaveta D. Gapechkina – <https://orcid.org/0000-0002-4626-3143>; Alexander A. Selyaninov – <https://orcid.org/0000-0001-8773-6894>;  
Marina I. Rychkova – <https://orcid.org/0000-0002-6598-5870>.

Received: 14.10.2022      Revised: 17.11.2022      Published: 27.12.2022

## Abstract

**Introduction.** In recent years, there has been an increase in fundamental interest in the search for effective, including microbiological, methods for processing pharmaceutical waste to obtain new biologically active compounds on their basis. Our results showed that the product of bacterial degradation of paracetamol (BDP) exhibits pronounced stimulating properties in relation to medicinal plants of the families *Plantaginaceae*, *Lamiaceae*, *Urticaceae*, *Linaceae* and can be used as an inducer of the accumulation of biologically active substances in them.

**Aim.** The purpose of this work is to study the effect of BDP on the dynamics of biomass accumulation and the content of flavonoids in the flowers of *Calendula officinalis* L., fam. Asteraceae in comparison with the control (water) and growth stimulator "Zircon".

**Materials and methods.** BDP obtained on the basis of the Laboratory of Alkanotrophic Microorganisms Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS (Perm). *Calendula officinalis* flowers collected from plants treated with BDP and Zircon growth stimulator were used to study the dynamics of dry biomass accumulation and changes in the content of flavonoids by the spectrophotometric method. For a comparative analysis of the intensity of the increase in the biomass of flowers during the treatment of plants with these agents, as well as to predict the accumulation of flavonoids, kinetic modeling was used.

**Results and discussion.** The total biomass harvest of *calendula officinalis* flowers when treated with BDP increased by 55 %, and when treated with the Zircon growth stimulator, by 24 % compared to the control. The content of flavonoids in flowers when treated with these agents increased by 101 and 40 %, respectively. The dates for the beginning of the collection of *calendula officinalis* flowers in the conditions of the Western Urals were determined: with the use of the Zircon growth stimulator – from July 20, BDP – from August 1, without treatment with growth stimulants – from August 14. Both stimulants increase the end date of the collection of raw materials by 10 days.

**Conclusion.** The product of bacterial degradation of paracetamol has a pronounced stimulating effect on *calendula officinalis*, significantly increasing the biomass of flowers and the content of flavonoids in them compared to the control (water) and growth stimulator "Zircon". With the use of kinetic modeling, the values of the parameters of the growth rate of the biomass of plant raw materials during the treatment of plants with these agents were established, a forecast was made for the accumulation of flavonoids, and the timing of the collection of *calendula officinalis* flowers in the conditions of the Western Urals was substantiated.

**Keywords:** biodegradation product of paracetamol, phytostimulation, *calendula officinalis*, flavonoids, kinetic modeling

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

**Contribution of the authors.** Elena V. Vihareva – planning an experiment, writing an article. Irina I. Mishenina, Elizaveta D. Gapechkina – conducting a field experiment, processing the results. Alexander A. Selyaninov – kinetic modeling. Marina I. Rychkova – obtaining a biodegradation product of paracetamol.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Vihareva E. V., Mishenina I. I., Gapechkina E. D., Selyaninov A. A., Rychkova M. I. Phyto-stimulating effect of paracetamol biodestruction product on *calendula officinalis*. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):31–37. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-31-37](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-31-37)

## ВВЕДЕНИЕ

Поиск эффективных, в том числе микробиологических, способов переработки фармацевтических отходов для получения на их основе новых полезных продуктов особенно актуален в настоящее время в связи проблемой глобального загрязнения окружающей среды лекарственными средствами и их метаболитами. Фармацевтические поллютанты, признанные новым классом ксенобиотиков, обнаруживаются в почве, донных осадках водоемов, поверхностных, сточных, грунтовых водах и даже питьевой воде [1–6]. Несмотря на относительно низкий уровень присутствия фармполлютантов в природной среде, их постоянное пополнение может привести к высоким долговременным концентрациям и стимулировать отрицательное воздействие на человека и природу [7–9]. Неизбежное попадание лекарственных средств (парацетамола в частности) в окружающую среду обусловлено их широким использованием и несовершенством способов утилизации фармацевтических

отходов (растворение в воде, сжигание, размещение на полигонах) [10–11]. Полученные нами результаты показали, что продукт бактериальной деструкции парацетамола (ПБП) актинобактериями рода *Rhodococcus* проявляет выраженные стимулирующие свойства в отношении лекарственных растений семейств *Plantaginaceae*, *Lamiaceae*, *Urticaceae*, *Linaceae* и др. и может использоваться как индуктор накопления в них биологически активных веществ [12].

В связи с этим **цель настоящего исследования** – изучить фитостимулирующее действие продукта биодеструкции парацетамола на лекарственные растения сем. *Asteraceae* на примере календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали продукт биодеструкции парацетамола (Anqiu Lu'an Pharmaceutical Co., Ltd., Китай) штаммом *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 из региональной профилированной коллекции алканотроф-

ных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, ЦКП 480868, УНУ 73559, WDCM 768)<sup>1</sup>, полученный на базе лаборатории алканотрофных микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН.

Для исследования динамики накопления биомассы цветков календулы лекарственной и содержания в них флавоноидов проводили полевой эксперимент с мая по октябрь на базе питомника Пермского государственного национального исследовательского университета имени А. Г. Генкеля. В эксперименте были использованы семена календулы лекарственной (агрофирма «Аэлита», Россия), посеянные в мае на трех площадках площадью 1,5 м<sup>2</sup> каждая (контрольной и двух опытных), не различающихся по освещенности и прочим условиям. На опытных площадках появившиеся через несколько дней после посадки проростки были обработаны суспензией ПБП (2 г на 1 л воды) и стимулятором роста «Циркон» фирмы ННПП «НЭСТ М» (1 мл на 10 л воды) [13]. Обработку растений данными агентами проводили трехкратно с интервалом один месяц. Цветки календулы лекарственной собирали в начале распускания трубчатых цветков с июля по октябрь, высушивали воздушно – теневым способом и использовали для определения прироста их биомассы гравиметрическим методом, а также изменения содержания флавоноидов спектрофотометрическим методом на основе реакции с хлоридом алюминия (спектрофотометр Portlab 511, Portlab, Россия)<sup>2</sup>. Для сравнительного анализа интенсивности прироста биомассы цветков и прогноза накопления в них флавоноидов применили кинетическое моделирование [14–15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий сбор биомассы цветков календулы лекарственной при обработке ПБП увеличился на

$$\frac{349,37 - 225,05}{225,05} \cdot 100\% = 55,2\%,$$

в то время как стимулятором роста «Циркон» – только на

$$\frac{280,14 - 225,05}{225,05} \cdot 100\% = 24,5\%$$

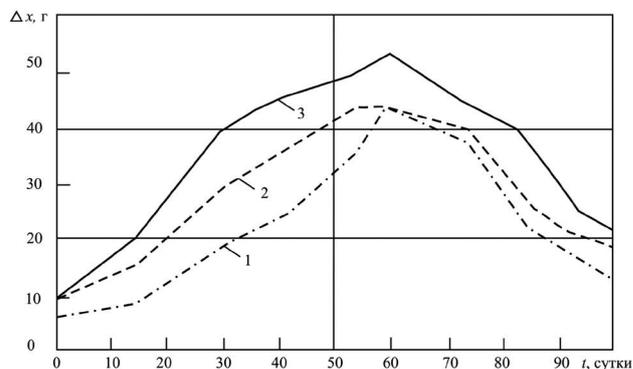
по сравнению с контролем (таблица 1). Таким образом, эффективность применения ПБП вместо стимулятора роста «Циркон» составила

<sup>1</sup> Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms (WDCM # 768). Available at: <http://iegmcol.ru/> Accessed: 21.10.2022.

<sup>2</sup> Государственная фармакопея РФ. Издание XIV. Т. IV. ФС.2.5.0030.15 «Ноготков лекарственных цветки». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0030-15-nogotkov-lekarstvennyh-tsvetki/> Ссылка активна на 21.10.2022.

$$\frac{349,37 - 280,14}{280,14} \cdot 100\% = 24,7\%.$$

Максимальный прирост биомассы цветков календулы лекарственной наблюдается на 59-е сут (рисунок 1). При этом прирост биомассы сначала увеличивается до 59 сут, после чего начинает уменьшаться примерно с той же скоростью. На первый взгляд создается впечатление, что сбор растительного сырья можно завершить. Однако порядка 40 % от общего сбора сырья получено после 60-ти сут, следовательно, сбор цветков календулы лекарственной можно продолжать до конца вегетационного периода, то есть до конца октября в условиях Западного Урала. Наблюдается увеличение прироста биомассы цветков при использовании обоих стимуляторов (кривые 2 и 3) по сравнению с контролем, однако при явном превышении положительного влияния ПБП над стимулятором роста «Циркон».



**Рисунок 1.** Зависимость прироста  $\Delta x$  сухой биомассы цветков календулы лекарственной от времени сбора:

1 – контроль; 2 – растения обработаны стимулятором роста «Циркон»; 3 – растения обработаны продуктом биодеградации парацетамола

**Figure 1.** Dependence of the increment  $\Delta x$  of dry biomass of calendula officinalis flowers on the collection time:

1 – control; 2 – plants treated with growth stimulator "Zircon"; 3 – plants treated with biodegradation product of paracetamol

Для сравнительного анализа интенсивности прироста биомассы цветков календулы лекарственной при обработке растений данными агентами применили кинетическое моделирование. При этом использовали кинетические уравнения 1-го порядка  $\frac{dx}{dt} = kx$

и 0-го порядка  $\frac{dx}{dt} = kx^0 = k$ .

Как видно из рисунка 2, количество собранной сухой биомассы цветков календулы лекарственной в интервале (0; 59) сут нарастает по экспоненциальной зависимости от времени, а в интервале (59; 101) сут – линейно. На нелинейном участке для опре-

Таблица 1. Динамика накопления сухой биомассы цветков календулы лекарственной

Table 1. Accumulation dynamics of dry biomass of calendula officinalis flowers

Дата сбора Collection date	Текущее время сбора $t$ , сут Current collection time $t$ , days	Масса цветков календулы лекарственной Mass of flowers of calendula officinalis					
		Контроль (вода) Control (water)		Растения обработаны стимулятором роста «Циркон» Plants are treated with growth stimulator "Zircon"		Растения обработаны ПБП Plants treated with BDP	
		$\Delta x^*$ , г $\Delta x^*$ , g	$x^*$ , г $x^*$ , g	$\Delta x^*$ , г $\Delta x^*$ , g	$x^*$ , г $x^*$ , g	$\Delta x^*$ , г $\Delta x^*$ , g	$x^*$ , г $x^*$ , g
16.07.18	0	5,55	5,55	9,05	9,05	9,10	9,10
30.07.18	14	8,60	14,15	14,90	23,95	19,55	28,65
16.08.18	31	18,70	32,85	28,90	52,85	39,85	68,50
27.08.18	42	24,40	57,25	35,40	88,25	46,20	114,70
07.09.18	53	34,05	91,30	43,45	131,70	49,55	164,25
13.09.18	59	44,10	135,40	43,60	175,30	53,85	218,10
28.09.18	74	38,20	173,60	39,60	214,90	45,22	263,32
10.10.18	86	21,70	195,30	25,95	240,85	38,60	301,92
17.10.18	93	17,30	212,60	21,05	261,90	26,40	328,32
25.10.18	101	12,45	225,05	18,24	280,14	21,05	349,37

Примечание.  $\Delta x^*$  – биомасса цветков на день сбора;  $x^*$  – накопленная биомасса.

Note.  $\Delta x$  is the biomass of flowers on the day of collection;  $x$  is accumulated biomass.

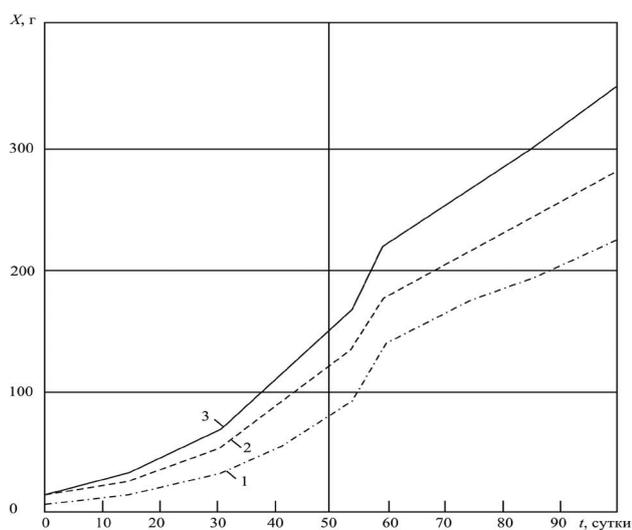


Рисунок 2. Зависимость количества сухой биомассы ( $x$ ) цветков календулы лекарственной от времени сбора:

1 – контроль; 2 – растения обработаны стимулятором роста «Циркон»; 3 – растения обработаны продуктом биодеструкции парацетамола

Figure 2. Dependence of the amount of dry biomass ( $x$ ) of flowers of calendula officinalis on the time of collection:

1 – control; 2 – plants treated with growth stimulator "Zircon"; 3 – plants treated with biodegradation product of paracetamol

деления скорости прироста биомассы использовали кинетическое уравнение 1-го порядка  $\frac{dx}{dt} = kx$  при

$x|_{t=0} = x_0$ , где  $x_0$  – количество сухой биомассы при  $t=0$ , то есть 5,55 г; 9,05 г и 9,10 г (таблица 1 и рису-

нок 2). Здесь  $k$  – параметр скорости роста собранной биомассы. Интегрируя дифференциальное уравнение:

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = k \int_0^t dt; \ln x - \ln x_0 = kt; \ln \frac{x}{x_0} = kt,$$

получили:  $x = x_0 \cdot e^{kt}$  – выражение для кинетических кривых в интервале (0; 59) суток. Параметр скорости роста биомассы  $k$ , определенный методом наименьших квадратов по данным таблицы 1, составил 0,04638; 0,05626 и 0,06314 сут<sup>-1</sup> для кривых 1, 2 и 3 соответственно.

На линейном участке кривых в интервале (59; 101) сут справедливо кинетическое уравнение 0-го порядка  $\frac{dx}{dt} = kx^0 = k$  при начальном условии

$x|_{t=59 \text{ суток}} = x_0^{59}$ , где  $x_0^{59}$  – данные таблицы 1 на 59-е сут. Отсюда выражение для кинетических кривых принимает вид:  $x = x_0^{59} + k(t - 59)$ . На линейном участке параметр скорости  $k$ , как и скорость прироста количества собранной биомассы, составили

$$\frac{225,05 - 135,40}{100 - 59} = 2,187, \quad \frac{280,14 - 175,30}{100 - 59} = 2,557$$

$$\text{и } \frac{349,37 - 218,10}{100 - 59} = 3,202 \text{ г/сут}$$

(для кривых 1, 2 и 3 на рисунке2).

Сравнение параметров скорости прироста биомассы цветков (таблица 2) показало, что на нелинейном и линейном участках кривых интенсивность

сбора при обработке растений ПБП выше, чем при обработке стимулятором роста «Циркон» (см. рисунок 2).

**Таблица 2.** Параметры скорости прироста биомассы цветков календулы лекарственной при обработке разными агентами

**Table 2.** Parameters of the biomass growth rate of calendula officinalis flowers treated with different agents

Параметры скорости* Speed options*	Интервал времени сбора, сут Collection time interval, days	Контроль Control	Растения обработаны стимулятором роста «Циркон» Plants are treated with growth stimulator "Zircon"	Растения обработаны ПБП Plants treated with BDP
$k, \text{сут}^{-1}$ $k, \text{day}^{-1}$	(0; 59)	0,04638	0,05626	0,06314
$k, \text{г/сут}$ $k, \text{g/day}$	(59; 100)	2,187	2,557	3,202

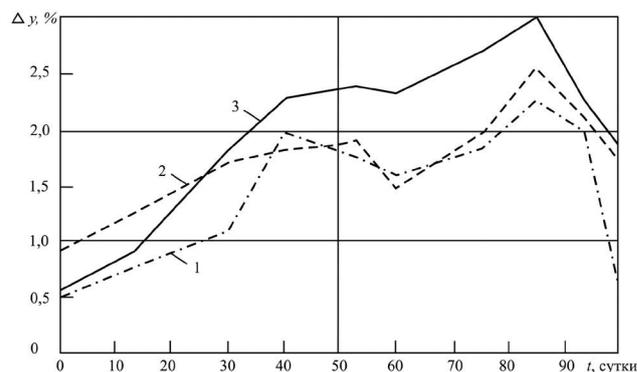
**Примечание.** \* Различие единиц измерения параметра скорости связано с различным порядком кинетического уравнения.

**Note.** \* The difference in the units of measurement of the velocity parameter is due to the different order of the kinetic equation.

Сравнительный анализ динамики накопления суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной показал преимущество обработки растений ПБП перед обработкой стимулятором роста «Циркон» и ростом без стимуляторов (контроль). Так на 59-й день при максимуме сбора биомассы (см. таблица 1) увеличение содержания флавоноидов в цветках при обработке растений ПБП составило 31,7 % по сравнению с контролем – водой (таблица 3). При использовании стимулятора роста «Циркон» содержание флавоноидов с 42-го по 74-й дни сбора находилось на уровне контрольных значений (рисунок 3).

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ содержание флавоноидов в цветках календулы лекарственной должно быть не менее 1%<sup>1</sup>, что наблюдалось в цветках, собранных с площадки, обработанной стимулятором роста «Циркон», уже на 5-й день сбора (рисунок 3). Однако дальнейшая стимуляция растений данным агентом оказалась менее эффективной по сравнению со стимуляцией ПБП. При обработке растений стимулятором роста «Циркон» датой начала сбора цветков календулы в рассматриваемый вегетационный период можно считать 20 июля, ПБП – 1 августа, а без обработки стимуляторами роста – 14 августа. При этом стимуляторы роста увеличивают дату окончания сбора растительного сырья на 10 суток (рисунок 3).

<sup>1</sup> Государственная фармакопея РФ. Издание XIV. Том IV. ФС.2.5.0030.15 «Ноготков лекарственных цветки». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0030-15-nogotkov-lekarstvennyh-tsvetki/> Ссылка активна на 21.10.2022.



**Рисунок 3.** Зависимость содержания флавоноидов ( $\Delta y$ ) в цветках календулы лекарственной от времени сбора:

1 – контроль; 2 – растения обработаны стимулятором роста «Циркон»; 3 – растения обработаны продуктом биодеструкции парацетамола

**Figure 3.** Dependence of the content of flavonoids ( $\Delta y$ ) in the flowers of calendula officinalis on the time of collection:

1 – control; 2 – plants treated with growth stimulator "Zircon"; 3 – plants treated with biodegradation product of paracetamol

Количество флавоноидов  $y, \text{г/м}^2$ , содержащееся в растительном сырье, собранном с  $1 \text{ м}^2$  площади посева, оценили по формуле (1):

$$y = \left( \sum_{i=1}^n \Delta y_i \Delta x_i \right) / (100 S), \quad (1)$$

где  $\Delta y_i$  – содержание флавоноидов на день сбора, % (см. таблицу 2);  $\Delta x_i$  – сухая биомасса на день сбора с содержанием флавоноидов не менее 1 %, г (см. таблицу 1);  $S$  – площадь участка,  $\text{м}^2$ ,  $n$  – количество дней сбора сырья.

Количество флавоноидов в цветках календулы лекарственной при обработке растений ПБП составило  $4,868 \text{ г/м}^2$ , стимулятором роста «Циркон» –  $3,400 \text{ г/м}^2$  и без обработки данными агентами –  $2,427 \text{ г/м}^2$ . Таким образом, при использовании ПБП содержание флавоноидов в цветках календулы лекарственной увеличилось на 100,6 %, а препарата «Циркон» – на 40,1 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продукт бактериальной деструкции парацетамола оказывает выраженное стимулирующее действие на календулу лекарственную (*Calendula officinalis* L.), сем. Asteraceae, существенно увеличивая биомассу цветков и содержание в них флавоноидов по сравнению с контролем (водой) и стимулятором роста «Циркон». С применением кинетического моделирования установлены значения параметров скорости роста биомассы растительного сырья при обработке растений данными агентами, осуществлен прогноз накопления флавоноидов и обоснованы сроки сбора цветков календулы лекарственной в условиях Западного Урала. Предложен математический подход к обработ-

**Таблица 3.** Динамика изменения содержания суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной при обработке разными агентами

**Table 3.** Dynamics of changes in the content of the total flavonoids in the flowers of calendula officinalis treated with different agents

Дата сбора Collection date	Текущее время сбора t, сут Current collection time t, days	Содержание суммы флавоноидов в цветках календулы лекарственной The content of the sum of flavonoids in the flowers of calendula officinalis		
		Контроль (вода) Control (water)	Растения обработаны стимулятором роста «Циркон» Plants are treated with growth stimulator "Zircon"	Растения обработаны ПБП Plants treated with BDP
		Ду*, %	Ду*, %	Ду*, %
16.07.18	0	0,49	0,79	0,56
30.07.18	14	0,79	1,23	0,91
16.08.18	31	1,18	1,63	1,69
27.08.18	42	1,97	1,73	2,27
07.09.18	53	1,82	1,90	2,32
13.09.18	59	1,67	1,59	2,20
28.09.18	74	1,92	2,02	2,52
10.10.18	86	2,34	2,65	2,99
17.10.18	93	1,97	2,20	2,31
25.10.18	101	0,64	1,68	1,88

**Примечание.** \*Ду – содержание флавоноидов в сырье на день сбора.

**Note.** \*Du is the content of flavonoids in raw materials on the day of collection.

ке результатов эксперимента, который может быть использован при анализе интенсивности прироста биомассы и прогноза накопления биологически активных веществ в различных лекарственных растениях, обработанных фитостимулирующими агентами.

## ЛИТЕРАТУРА

- Fekadu S., Alemayehu E., Dewil R., Van der Bruggen B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment*. 2019;654:324–337. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.072.
- Moreau M., Hadfield J., Hughey J., Sanders F., Lapworth D. J., White D., Civil W. A baseline assessment of emerging organic contaminants in New Zealand groundwater. *Science of the Total Environment*. 2019;686:425. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.210.
- Madikizela L. M., Botha T. L., Kamika I., Msagati T. A. M. Uptake, Occurrence, and Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Analgesics in Plants and Edible Crops. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;70:34–45. DOI: 10.1021/ACS.JAFC.1C06499.
- Madikizela L. M., Ncube S. Occurrence and ecotoxicological risk assessment of non-steroidal anti-inflammatory drugs in South African aquatic environment: What is known and the missing information. *Chemosphere*. 2021;280:130688. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130688.
- Yan J., Lin W., Gao Z., Ren Y. Use of selected NSAIDs in Guangzhou and other cities in the world as identified by wastewater analysis. *Chemosphere*. 2021;279:130529. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130529.
- Hanafiah Z. M., Wan Mohtar W. H. M., Abd Manan T. S. B., Bachhi N. A., Abdullah N. A., Abd Hamid H. H., Beddu S., Mohd Kamal N. L., Ahmad A., Wan Rasdi N. The occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Malaysian urban domestic wastewater. *Chemosphere*. 2022;287:132134. DOI: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132134.
- Gimenez V., Nunes B. Effects of commonly used therapeutic drugs, paracetamol, and acetylsalicylic acid, on key physiological traits of the sea snail *Gibbula umbilicalis*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26(21):21858–21870. DOI: 10.1007/s11356-019-04653-w.
- Almeida A., Sole M., Soares A. M. V. M., Freitas R. Anti-inflammatory drugs in the marine environment: Bioconcentration, metabolism and sub-lethal effects in marine bivalves. *Environmental Pollution*. 2020;263(Pt A):114442. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114442.
- Staszny A., Dobosy P., Maasz G., Szalai Z., Jakab G., Pirger Z., Szaberenyi J., Molnar E., Pap L. O., Juhasz V., Weiperth A., Urbanyi B., Kondor A. C., Ferincz A. Effects of pharmaceutically active compounds (PhACs) on fish body and scale shape in natural waters. *PeerJ*. 2021;9:e10642. DOI: 10.7717/peerj.10642.
- Ivshina I., Tyumina E., Vikhareva E. Biodegradation of emerging pollutants: Focus on pharmaceuticals. *Microbiology Australia*. 2018;39(3):117–122. DOI: 10.1071/MA18037.
- Singh V., Suthar S. Occurrence, seasonal variations, and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in River Ganges at two holy cities of India. *Chemosphere*. 2021;268:129331. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129331.
- Мишенина И. И., Вихарева Е. В., Гуляев Д. К. Исследование фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции парацетамола на лекарственные растения семейства Яснотковые. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2020;22(4):62–66. DOI: 10.26787/nudha-2686-6838-2020-22-4-62-66.
- Малеванная Н. Н. Рострегулирующий комплекс, способ его получения, препарат на его основе и применение в сельскохозяйственной практике. Патент РФ на изобретение № RU 2257059 С1. 27.07.2005. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2257059C1/ru>. Ссылка активна на 22.10.2022.
- Селянинов А. А., Осипенко М. А., Баранова А. А., Вихарева Е. В., Хренков А. Н. Числовые характеристики кинетически моделируемого простого нестационарного случайного процесса. *Прикладная математика и вопросы управления*. 2019;3:65–83. DOI: 10.15593/2499-9873/2019.3.04.
- Хренков А. Н., Вихарева Е. В., Тумилович Е. Ю., Карпенко Ю. Н., Селянинов А. А., Тюмина Е. А. Хроматографический анализ ацетилсалициловой кислоты в культуральных жидкостях родококков. *Вестник Московского университета*. 2020;61(5):388–393. DOI: 10.3103/S0027131420050053.

## REFERENCES

1. Fekadu S., Alemayehu E., Dewil R., Van der Bruggen B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of the Total Environment*. 2019;654:324–337. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.072.
2. Moreau M., Hadfield J., Hughey J., Sanders F., Lapworth D. J., White D., Civil W. A baseline assessment of emerging organic contaminants in New Zealand groundwater. *Science of the Total Environment*. 2019;686:425. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.210.
3. Madikizela L. M., Botha T. L., Kamika I., Msagati T. A. M. Uptake, Occurrence, and Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Analgesics in Plants and Edible Crops. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;70:34–45. DOI: 10.1021/ACS.JAFC.1C06499.
4. Madikizela L. M., Ncube S. Occurrence and ecotoxicological risk assessment of non-steroidal anti-inflammatory drugs in South African aquatic environment: What is known and the missing information. *Chemosphere*. 2021;280:130688. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130688.
5. Yan J., Lin W., Gao Z., Ren Y. Use of selected NSAIDs in Guangzhou and other cities in the world as identified by wastewater analysis. *Chemosphere*. 2021;279:130529. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130529.
6. Hanafiah Z. M., Wan Mohtar W. H. M., Abd Manan T. S. B., Bachi N. A., Abdullah N. A., Abd Hamid H. H., Beddu S., Mohd Kamal N. L., Ahmad A., Wan Rasdi N. The occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Malaysian urban domestic wastewater. *Chemosphere*. 2022;287:132134. DOI: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132134.
7. Gimenez V., Nunes B. Effects of commonly used therapeutic drugs, paracetamol, and acetylsalicylic acid, on key physiological traits of the sea snail *Gibbula umbilicalis*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26(21):21858–21870. DOI: 10.1007/s11356-019-04653-w.
8. Almeida A., Sole M., Soares A. M. V. M., Freitas R. Anti-inflammatory drugs in the marine environment: Bioconcentration, metabolism and sub-lethal effects in marine bivalves. *Environmental Pollution*. 2020;263(Pt A):114442. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114442.
9. Staszny A., Dobosy P., Maasz G., Szalai Z., Jakab G., Pirger Z., Szberenyi J., Molnar E., Pap L. O., Juhasz V., Weiperth A., Urbanyi B., Kondor A. C., Ferincz A. Effects of pharmaceutically active compounds (PhACs) on fish body and scale shape in natural waters. *PeerJ*. 2021;9:e10642. DOI: 10.7717/peerj.10642.
10. Ivshina I., Tyumina E., Vikhareva E. Biodegradation of emerging pollutants: Focus on pharmaceuticals. *Microbiology Australia*. 2018;39(3):117–122. DOI: 10.1071/MA18037.
11. Singh V., Suthar S. Occurrence, seasonal variations, and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products in River Ganges at two holy cities of India. *Chemosphere*. 2021;268:129331. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129331.
12. Mishenina I. I., Vikhareva E. V., Gulyaev D. K. The study fitostimulin action of the products of biodegradation of paracetamol on medicinal plants of the family Lamiaceae. *Medical & pharmaceutical journal "Pulse"*. 2020;22(4):62–66. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-4-62-66.
13. Malevannaya N. N. Growth-regulating complex, method of its production, drug based on it and application in agricultural practice. Patent RUS № 2257059 C1. 27.07.2005. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2257059C1/ru>. Accessed: 22.10.2022. (In Russ.)
14. Selyaninov A. A., Osipenko M. A., Baranova A. A., Vikhareva E. V., Khrenkov A. N. Numerical characteristics of a kinetically modeled simple non-stationary random process. *Applied Mathematics and Control Sciences*. 2019;3:65–83. (In Russ.) DOI: 10.15593/2499-9873/2019.3.04.
15. Khrenkov A. N., Vikhareva E. V., Tumilovich E. Yu., Karpenko Yu. N., Selyaninov A. A., Tyumina E. A. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2020;61(5):309–314. (In Russ.) DOI: 10.3103/S0027131420050053.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-38-42](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-38-42)  
УДК 547.854.1



Оригинальная статья / Research article

## Синтез и оценка нестероидной противовоспалительной активности N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин- 5-карбоксамидов

Н. А. Бузмакова✉, И. П. Рудакова, Т. М. Замаараева, Н. В. Дозморова, Н. В. Слепова

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

✉ Контактное лицо: Бузмакова Надежда Альбертовна. E-mail: ledysummer@mail.ru

ORCID: Н. А. Бузмакова – <https://orcid.org/0000-0003-3171-0438>; И. П. Рудакова – <https://orcid.org/0000-0003-2227-8313>; Т. М. Замаараева – <https://orcid.org/0000-0002-9932-9628>; Н. В. Дозморова – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>; Н. В. Слепова – <https://orcid.org/0000-0003-3924-3715>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 28.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Среди производных пиримидина обнаружено большое число новых перспективных биологически активных соединений, обладающих различной фармакологической активностью. Сотрудниками Пермской государственной фармацевтической академии предложен простой и доступный способ синтеза функционализированных тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов, заключающийся в кратковременном сплавлении исходных компонентов. Продукты данной реакции ранее показали высокую анальгетическую и противовоспалительную активность.

**Цель.** Получить ранее неизвестные функционализированные пиримидины и изучить их анальгетическую, противовоспалительную и жаропонижающую активность.

**Материалы и методы.** Объекты исследования – 11 соединений N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамиды, строение которых подтверждено спектральными методами анализа. Оценку биологической активности проводили рекомендованными методами по доклиническому изучению новых фармакологических веществ.

**Результаты и обсуждение.** В данной работе приведены результаты доклинических испытаний полученных соединений.

**Заключение.** Некоторые соединения продемонстрировали высокую анальгетическую, противовоспалительную и жаропонижающую активность и могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве перспективных нестероидных противовоспалительных средств.

**Ключевые слова:** реакция Биджинелли, N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамиды, анальгетическая активность, противовоспалительная активность, жаропонижающая активность

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

**Вклад авторов.** Н. А. Бузмакова, Т. М. Замаараева, Н. В. Слепова, Н. В. Дозморова осуществили синтез соединений и доказали строение. Н. А. Бузмакова и И. П. Рудакова провели исследования биологической активности соединений. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Бузмакова Н. А., Рудакова И. П., Замаараева Т. М., Дозморова Н. В., Слепова Н. В. Синтез и оценка нестероидной противовоспалительной активности N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):38–42. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-38-42](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-38-42)

## The Synthesis and Evaluation of Non-steroidal Antiinflammatory Activity of N,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides

Nadezhda A. Buzmakova✉, Irina P. Rudakova, Tatiana M. Zamaraeva, Natalia V. Dozmorova,  
Nadezhda V. Slepova

<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, Poleyaya str., Perm, 614990, Russia

✉ Corresponding author: Nadezhda A. Buzmakova. E-mail: ledysummer@mail.ru

ORCID: Nadezhda A. Buzmakova – <https://orcid.org/0000-0003-3171-0438>; Irina P. Rudakova – <https://orcid.org/0000-0003-2227-8313>; Tatiana M. Zamaraeva – <https://orcid.org/0000-0002-9932-9628>; Natalia V. Dozmorova – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>; Nadezhda V. Slepova – <https://orcid.org/0000-0003-3924-3715>.

Received: 14.10.2022

Revised: 28.11.2022

Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** New potential biologically active compounds with different pharmacological activities were found among pyrimidine derivatives. Simple and available synthesis of tetrahydropyrimidine-5-carboxamides was developed in Perm State Pharmaceutical Academy. Products of this reaction previously shown high analgesic and anti-inflammatory activities.

© Бузмакова Н. А., Рудакова И. П., Замаараева Т. М., Дозморова Н. В., Слепова Н. В., 2022

© Buzmakova N. A., Rudakova I. P., Zamaraeva T. M., Dozmorova N. V., Slepova N. V., 2022

**Aim.** To get previously unknown functionalized pyrimidines and to study their analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities.

**Materials and methods.** 11 compounds *N*,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides are objects of research. Their structure has been confirmed by spectroscopy methods. The biological activities were carried out by recommended methods for preclinical study of new pharmacological substances.

**Results and discussion.** This paper presents the results of preclinical tests of the obtained compounds.

**Conclusion.** Some compounds demonstrated high analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities and could be recommend for further study as perspective non-steroidal drugs.

**Keywords:** Biginelly reaction, *N*,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides, analgesic activity, anti-inflammatory activity, antipyretic 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.** Nadezhda A. Buzmakova, Tatiana M. Zamaraeva, Nadezhda V. Slepova and Natalia V. Dozmorova carried out the synthesis of the substances. Nadezhda A. Buzmakova and Irina P. Rudakova conducted studies of the biological activity of compounds. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Buzmakova N. A., Rudakova I. P., Zamaraeva T. M., Dozmorova N. V., Slepova N. V. The synthesis and evaluation of non-steroidal antiinflammatory activity of *N*,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides. *Drug development & registration*. 2022;11(4-1):38-42. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-38-42](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-38-42)

## ВВЕДЕНИЕ

Производные пиримидина играют огромную роль в процессах жизнедеятельности человека, они составляют структурную основу нуклеиновых кислот, входят в состав природных и синтетических лекарственных средств [1]. В литературных источниках имеются данные о наличии у производных пиримидина противовирусной [2, 3], противоопухолевой [4], гипотензивной [5], антиоксидантной, противомикробной активности [6, 7].

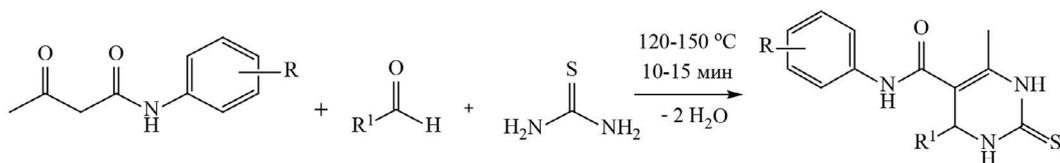
Одним из известных способов получения пиримидиновых оснований является трехкомпонентная реакция Биджинелли [1]. Многокомпонентные реакции чрезвычайно популярны в области синтетической химии, благодаря своей эффективности, безопасности, экономичности [8]. Они позволяют получать продукты со сложной структурой из коммерчески и синтетически доступных реагентов.

Сотрудниками кафедры общей и органической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России было обнаружено, что трехкомпонентная реакция Биджинелли, в которой в качестве β-дикарбонильного соединения участвуют *N*-замещенные амиды ацетилуксусной кислоты протекает легче и с более высокими выходами,

чем в случае использования эфиров ацетилуксусной кислоты, и в дальнейшем разработан общий доступный метод синтеза карбамоилпроизводных пиримидина реакцией Биджинелли, основанный на сплавлении исходных компонентов [9]. Предыдущие исследования показали, что в ряду *N*,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов целесообразен поиск веществ с анальгетической [9] и противовоспалительной активностью [10]. Помимо этого, анализ потенциальных видов активности по системе PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) у данного ряда соединений показал, что высока вероятность проявления анальгетической, неопиоидной активности ( $P_a > 0,6$ ).

**Целью работы** является получение ранее неизвестных функционализированных пиримидинов и изучение их биологической активности. Взаимодействием *N*-ариламидов ацетилуксусной кислоты, ариальдегидов, тиомочевины, используя известный подход, осуществлен синтез новых *N*,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов (I а-л) (рисунок 1).

Выходы соединений I а-л составляют 63–91 %. Выход образующихся соединений зависит в определенной степени от характера заместителя в ариальде-



R = H (а-в); 2-Cl (г-ж); 2-CH<sub>3</sub> (з, и); 2,4-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (к, л); R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (а); 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (б); 3-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (в); 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (г); 2,4-Cl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (д); 4-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (е); 2-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (ж); 3-НОС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (з); 4-С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (и); 4-Н<sub>3</sub>СС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (к); 4-ОНС<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (л)

**Рисунок 1.** Схема синтеза соединений I а-л

гиде – в случае присутствия электроноакцепторных заместителей в *орто*- или *пара*- положении наблюдается увеличение выхода продукта реакции, при наличии электронодонорных заместителей наблюдается его снижение.

Соединения (I а-л) представляют собой белые или желтые кристаллические вещества, растворимые в хлороформе, ДМФА, ДМСО, при нагревании – в этаноле, ледяной уксусной кислоте, практически нерастворимы в воде. В ИК- и <sup>1</sup>H ЯМР-спектрах количество и характер сигналов соответствует структуре полученных N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов.

В ИК спектрах соединений (I а-л) присутствуют полосы валентных колебаний карбонила амидной группы (1668–1680), связей N–H (3230–3280), C=C (1592–1616), C=S (1200–1210). В протонных спектрах, помимо сигналов ароматических протонов (6.94–7.48 м.д.) и связанных с ароматическим кольцом групп, присутствуют синглеты протонов метильной (1.97–2.04 м.д.) и амидной групп (9.59–9.64 м.д.), дублеты протонов в 1 (9.22–9.35 м.д.) и 6 положении (5.33–5.63 м.д.), уширенный синглет протона в 3 положении (9.86–10.0 м.д.), что свидетельствует о возможности существования соединений в двух таутомерных формах (рисунок 2).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИК-спектры соединений записывали на спектрофотометре Spесord M-80 в таблетках KBr. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H регистрировали на приборе Bruker 500 (рабочая частота 500,13 МГц) в растворе ДМСO-d<sub>6</sub>, внутренний стандарт – ТМС.

Все исследовательские работы с лабораторными животными выполняли в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в организации, производящей исследования, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей<sup>1</sup>.

Анальгетическую активность соединений определяли на беспородных мышах массой 20–25 г, содержащихся на обычном рационе вивария, по методике «уксусных корчей» (характерные движения животных, включающие сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягиванием задних конечностей и прогибанием спины) [11]. Количество животных в опытной и контрольной группах – 6. Уксусную кислоту вводили в виде 0,75 %-ного раствора внутривбрюшинно в левую подвздошную область в объеме 0,2 мл, подсчет «корчей» начинали сразу и производили в течение 15 мин.

<sup>1</sup> Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Доступно по: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_203348/2ff7a8c72de3994f30496a0ccbb1ddafdaddd518/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_203348/2ff7a8c72de3994f30496a0ccbb1ddafdaddd518/) Ссылка активна на 21.10.2022.

Исследуемые соединения вводили внутривбрюшинно в правую подвздошную область в дозе 50 мг/кг за 30 мин до введения уксусной кислоты [11]. Эффект оценивали по уменьшению количества «корчей» по сравнению с контрольными животными. Результаты статистически обработаны с вычислением критерия Фишера – Стьюдента. Эффект считали достоверным при  $p < 0,05$ . В качестве эталонов сравнения использовали метамизол натрия (АО «Усолье-Сибирский химфармзавод», Россия) и нимесулид («Нимесил», Laboratorios Menarini S.A., Испания) в дозе 50 мг/кг. Результаты приведены в таблице 1.

**Таблица 1. Анальгетическая и противовоспалительная активность N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов**

**Table 1. Analgesic and anti-inflammatory activity of N,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides**

Соединение Compound	Количество корчей Number of writhing	% уменьшения корчей % reduction in writhing	Прирост объема стопы через 3 часа, % Increase in foot volume after 3 hours, %	Торможение реакции, % Reaction inhibition, %
а	4,6 ± 2,4*	<b>85,0</b>	15,6 ± 5,5**	<b>79,5</b>
б	12,5 ± 1,8*	59,2	–	–
в	15,7 ± 2,3*	48,7	–	–
г	4,9 ± 1,8*	<b>84,0</b>	29,3 ± 6,9*	<b>81,5</b>
д	12,8 ± 5,3*	58,2	–	–
е	10,2 ± 2,8*	<b>64,1</b>	14,2 ± 4,2**	81,5
ж	6,2 ± 2,1*	<b>79,7</b>	20,9 ± 5,9*	72,8
з	10,4 ± 2,4	<b>66,0</b>	38,7 ± 7,6*	49,5
и	9,1 ± 2,6*	<b>70,3</b>	57,8 ± 7,7	24,6
к	17,8 ± 2,8*	41,8	–	–
л	7,2 ± 1,7*	<b>76,5</b>	34,2 ± 6,2*	55,4
Метамизол натрия Metamizole sodium	16,0 ± 3,5*	47,7	–	–
Нимесулид Nimesulide	7,5 ± 2,2*	75,5	33,9 ± 6,8*	55,7
Контроль Control	30,6 ± 2,2	–	76,6 ± 7,1	–

**Примечание.** \* Различие достоверно по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

\*\* Различие достоверно по сравнению с нимесулидом при  $p < 0,05$ .

**Note.** \* The difference is significant in comparison with the control at  $p < 0.05$ .

\*\* The difference is significant in comparison with nimesulide at  $p < 0.05$ .

Противовоспалительную активность соединений с наиболее высокой анальгетической активностью (I а, г, е, ж, з, и, л) исследовали на «карагениновой модели», по оценке прироста объема стопы крыс после введения флогенного агента. Исследование проводилось на нелинейных половозрелых крысах массой 180–250 г, обоего пола, группа включала 6 животных.

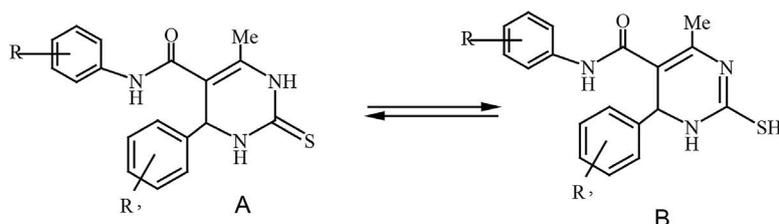


Рисунок 2. Возможность существования соединений в двух таутомерных формах

Таблица 2. Жаропонижающая активность *N*,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов

Table 2. Antipyretic activity of *N*,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides

Препарат Drug	Температура тела в градусах Body temperature in degrees				
	Исходная Initial	Срок после введения пирогенала, ч The period after the introduction of pyrogeneal, h			
		1	2	3	4
Контроль Control	37,1 ± 0,3	37,8 ± 0,4 <i>p</i> > 0,05	38,5 ± 0,2 <i>p</i> < 0,05*	38,2 ± 0,1 <i>p</i> < 0,05*	37,1 ± 0,3 <i>p</i> > 0,05
Ацетилсалициловая кислота Acetylsalicylic acid	37,3 ± 0,3	38,0 ± 0,2 <i>p</i> < 0,05* <i>p'</i> > 0,05	38,0 ± 0,2 <i>p</i> < 0,05* <i>p'</i> > 0,05	37,5 ± 0,1 <i>p</i> > 0,05 <i>p'</i> < 0,05*	37,5 ± 0,1 <i>p</i> > 0,05 <i>p'</i> > 0,05
Соединение I г Compound I g	37,8 ± 0,1	38,2 ± 0,2 <i>p</i> > 0,05 <i>p'</i> > 0,05 <i>p''</i> > 0,05	36,3 ± 0,3 <i>p</i> < 0,001* <i>p'</i> < 0,001* <i>p''</i> < 0,002*	36,8 ± 0,3 <i>p</i> < 0,02* <i>p'</i> < 0,001* <i>p''</i> < 0,05*	36,9 ± 0,2 <i>p</i> < 0,001* <i>p'</i> > 0,05 <i>p''</i> < 0,02*
Соединение I а Compound I а	37,9 ± 0,2	38,2 ± 0,4 <i>p</i> > 0,05 <i>p'</i> > 0,05 <i>p''</i> > 0,05	36,8 ± 0,1 <i>p</i> < 0,001* <i>p'</i> < 0,001* <i>p''</i> < 0,001*	37,0 ± 0,2 <i>p</i> < 0,02* <i>p'</i> < 0,001* <i>p''</i> < 0,05*	36,9 ± 0,2 <i>p</i> < 0,01* <i>p'</i> > 0,05 <i>p''</i> < 0,02*

Примечание. *p* – достоверность различий в сравнении с исходным уровнем.

*p'* – достоверность различий в сравнении с контролем.

*p''* – достоверность различий в сравнении с ацетилсалициловой кислотой.

\* Статистически значимое отличие.

Note. *p* – significance of differences in comparison with the baseline.

*p'* – significance of differences in comparison with control.

*p''* – significance of differences in comparison with acetylsalicylic acid.

\* Statistically significant difference

Острую воспалительную реакцию воспроизводили субплантарным введением 0,1 мл 1 % раствора каррагинена (сульфатированный полисахарид из ирландского морского мха). Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3 ч после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически) [12]. Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг за 30 минут до введения флогогенного агента.

Противовоспалительный эффект, оцениваемый по уменьшению отека, выражали в процентах к контролю. Контролем служили животные не получавшие препарата. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента. Препаратом сравнения выступал нимесулид в дозе 50 мг/кг («Нимесил», Laboratorios Menarini S.A., Испания). Результаты приведены в таблице 1.

Жаропонижающие свойства соединений оценивали по их способности оказывать гипотермический эффект у животных с лихорадкой.

Опыты проводили на крысах обоего пола, массой 180–200 г. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде взвеси с 1 % крахмальной слизью. Каждое соединение изучали на 6 крысах. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Гипертермию у крыс вызывали внутривенным введением пирогенала в дозе 50 мкг/кг массы тела за 1 час до введения препарата [11]. Измерение температуры тела проводили в прямой кишке с помощью электронного термометра ежедневно на протяжении 4 часов после введения пирогенала. О жаропонижающей активности препарата судили по его способности ослаблять гипертермическую реакцию у крыс. Оценку действия проводили через 1 час после внутрибрюшинного введения препарата на фоне максимального повышения температуры и в динамике. Препаратом сравнения – ацетилсалициловая кислота (ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика», Россия), как наиболее популярное жаропонижающее средство. Данные приведены в таблице 2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Как видно из приведенных результатов, все исследуемые соединения обладают анальгетической активностью, достоверно уменьшают количество корчей. Достоверно большее уменьшение корчей по сравнению с метамизолом натрия вызывают вещества I а, г, ж, л., их активность сопоставима с нимесулидом.

Профилактическое введение исследуемых соединений достоверно вызывает торможение воспалительной реакции по сравнению с контролем. Соединение I и не вызывает достоверного уменьшения объема стопы после введения каррагенина по сравнению с контрольной группой. В то время, как соединения I а, е достоверно превышают эффект нимесулида.

При изучении жаропонижающей активности обнаружено, что оба исследованных соединения показали достоверный жаропонижающий эффект по сравнению с препаратом сравнения – ацетилсалициловой кислотой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили выявить новые соединения обладающие анальгетической, противовоспалительной и жаропонижающей активностью. Отмечено, что в случае присутствия в структуре соединений разветвленных алкильных заместителей в ароматическом альдегиде и галогенов наблюдается более выраженное НПВС – действие. Таким образом, поиск соединений с биологической активностью среди производных N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов является перспективным.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Heravi M., Zadsirjan V. Recent Advances in Applications of Name Reactions in Multicomponent Reactions. Amsterdam: Elsevier; 2020. 438 p.
2. Matos L. H. S., Masson Flá. T., Simeoni L. A., Homem-de-Mello M. Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *European J. of Med. Chem.* 2018;143:1779–1789. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.073.
3. Kaoukabi H., Kabri Y., Curti C. Taourirte M., Rodriguez-Ubis J. C., Snoeck R., Graciela A., Vanelle P., Lazrek H. B. Dihydropyrimidinone/1,2,3-triazole hybrid molecules: Synthesis and anti-varicella-zoster virus (VZV) evaluation. *European J. of Med. Chem.* 2018;155:772–781. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.06.028.
4. Barbosa F. A. R., Siminski T., Canto R. F. S., Almeida G. M., Mota N., Ourique F., Pedrosa R. C., Braga A. L. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma. *European J. of Med. Chem.* 2018;155:503–515. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.06.026.
5. Teleb M., Rizk O. H., Zhang F-X., Fronczek F. R., Zamponi G. W., Fahmy H. Design, synthesis and pharmacological evaluation of some substituted dihydropyrimidines with L/T-type Calcium Channel blocking activities. *Bioorg. Chem.* 2018;83:354–366. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.10.054.
6. Khaldi-Khellafi N., Makhloufi-Chebli M., Oukacha-Hikem D., Bouaziz S. T., Lamara K. O., Idir T., Benazzouz-Touami A., Dumas F. Green synthesis, Antioxidant and antibacterial activities of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidinones/thiones derivatives of curcumin. Theoretical calculations and mechanism study. *J. of Mol. Struct.* 2019;1181:261–269. DOI 10.1016/j.molstruc.2018.12.104.
7. Noureddin S. A., El-Shishtawy R. M., Al-Footy K. O. Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs.

- European J. of Med. Chem.* 2018;182: 111631. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111631.
8. Dangolani S. K., Niknama E., Shahraki O., Khalafi-Nezhad A. Unexpected dihydropyridinium derivatives using a multicomponent reaction containing unprotected amino acids. *Journal of Molecular Structure.* 2021;1245:131061. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.131061.
9. Гейн В. Л., Замараева Т. М., Бузмакова Н. А., Сыропятов Б. Я., Аликина Н. В. Синтез и анальгетическая активность N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2016;50(4):19–21. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-4-19-21.
10. Бузмакова Н. А., Рудакова И. П., Замараева Т. М. Синтез и противовоспалительная активность N,6-диарил-4-метил-2-тиоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2021;55(8):21–24. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-21-24.
11. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
12. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Изд-во Медицина; 2005. 826 с.

## REFERENCES

1. Heravi M., Zadsirjan V. Recent Advances in Applications of Name Reactions in Multicomponent Reactions. Amsterdam: Elsevier; 2020. 438 p.
2. Matos L. H. S., Masson Flá. T., Simeoni L. A., Homem-de-Mello M. Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *European J. of Med. Chem.* 2018;143:1779–1789. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.073.
3. Kaoukabi H., Kabri Y., Curti C. Taourirte M., Rodriguez-Ubis J. C., Snoeck R., Graciela A., Vanelle P., Lazrek H. B. Dihydropyrimidinone/1,2,3-triazole hybrid molecules: Synthesis and anti-varicella-zoster virus (VZV) evaluation. *European J. of Med. Chem.* 2018;155:772–781. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.06.028.
4. Barbosa F. A. R., Siminski T., Canto R. F. S., Almeida G. M., Mota N., Ourique F., Pedrosa R. C., Braga A. L. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma. *European J. of Med. Chem.* 2018;155:503–515. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.06.026.
5. Teleb M., Rizk O. H., Zhang F-X., Fronczek F. R., Zamponi G. W., Fahmy H. Design, synthesis and pharmacological evaluation of some substituted dihydropyrimidines with L/T-type Calcium Channel blocking activities. *Bioorg. Chem.* 2018;83:354–366. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.10.054.
6. Khaldi-Khellafi N., Makhloufi-Chebli M., Oukacha-Hikem D., Bouaziz S. T., Lamara K. O., Idir T., Benazzouz-Touami A., Dumas F. Green synthesis, Antioxidant and antibacterial activities of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidinones/thiones derivatives of curcumin. Theoretical calculations and mechanism study. *J. of Mol. Struct.* 2019;1181:261–269. DOI 10.1016/j.molstruc.2018.12.104.
7. Noureddin S. A., El-Shishtawy R. M., Al-Footy K. O. Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs. *European J. of Med. Chem.* 2018;182: 111631. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111631.
8. Dangolani S. K., Niknama E., Shahraki O., Khalafi-Nezhad A. Unexpected dihydropyridinium derivatives using a multicomponent reaction containing unprotected amino acids. *Journal of Molecular Structure.* 2021;1245:131061. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.131061.
9. Gein V. L., Zamaraeva T. M., Buzmakova N. A., Syropyatov B. Y., Alikina N. V. Synthesis and analgesic activity of N,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016;50(4):19–21. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-4-19-21.
10. Buzmakova N. A., Rudakova I. P., Zamaraeva T. M. Synthesis and anti-inflammatory activity of N,6-diaryl-4-methyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxamides. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016;50(4):19–21. (In Russ.) DOI 10.30906/0023-1134-2016-50-4-19-21.
11. Mironov A. N., Bunatyan N. D. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Moscow: Grif and K; 2012. 944 p. (In Russ.)
12. Khabriev R. U. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: izd-vo Medicina; 2005. 826 p. (In Russ.)

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-43-47](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-43-47)  
УДК 615.282.84 + 615.454.1 + 547.589.4



Оригинальная статья / Research article

## Изучение противогрибковой активности экспериментальных мягких лекарственных форм на основе гидразонопроизводного гетариламида 4-фенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислоты

Ф. В. Собин , Н. А. Пулина, В. В. Новикова

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

✉ Контактное лицо: Собин Федор В. E-mail: fff-2005@mail.ru

ORCID: Ф. В. Собин – <https://orcid.org/0000-0002-8416-6934>; Н. А. Пулина – <https://orcid.org/0000-0002-0435-0484>; В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 21.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** В последнее время наблюдается существенный рост грибковых инфекций. Наиболее распространенным является вульвовагинальный кандидоз, поражающий миллионы женщин во всем мире. К существующим противогрибковым препаратам формируется резистентность, и они не лишены побочных эффектов. Ранее нами была показана высокая противомикробная активность производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот. Перспективным является создание мягких лекарственных форм на их основе и изучение противогрибкового действия.

**Цель.** Разработать экспериментальные мягкие лекарственные формы на основе одного из наиболее активных производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот и оценить влияние состава мазевой композиции на выраженность антифунгального действия.

**Материалы и методы.** В качестве фармакологически активного компонента было использовано синтезированное нами гидразонопроизводное гетариламида 4-фенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислоты, обладающее выраженной противогрибковой активностью. Разработаны 8 экспериментальных мягких лекарственных форм на основах гидрофобного и гидрофильного характера. Действующее вещество в концентрации 1 % вводилось стандартными технологическими способами по правилам изготовления дерматологических мазей. Для определения противогрибковой активности полученных мазей использовали трехгнездный вариант метода диффузии в агар. Препараты сравнения 2%-й крем «Пимафуцин» и 1%-й крем «Клотримазол».

**Результаты и обсуждение.** Все изученные экспериментальные мягкие лекарственные формы проявили противогрибковое действие различной степени выраженности. Наибольший фармакологический эффект обнаружен у мазевых композиций на основе гидрофильных компонентов натрий-карбоксиметилцеллюлозы и полиэтиленоксидов. Их противогрибковое действие сопоставимо или превышает эффект препаратов сравнения.

**Заключение.** Разработаны 8 экспериментальных мягких лекарственных форм на основе производного 4-фенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислоты. Изучена их противогрибковая активность. Выбраны два наиболее активных образца экспериментальных мазей для дальнейшего углубленного изучения.

**Ключевые слова:** производные 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислот, противогрибковая активность, мягкие лекарственные формы

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

**Вклад авторов.** Ф. В. Собин синтезировал фармакологически активный компонент, подобрал составы и изготовил экспериментальные мягкие лекарственные формы на его основе, принимал непосредственное участие в написании и корректировке статьи. Н. А. Пулина осуществляла научно-технологическое руководство проведенных исследований и рецензировала статью. В. В. Новикова изучила противогрибковую активность экспериментальных мазевых композиций в отношении типового штамма *C. albicans* NCTC 885-653 трехгнездным вариантом метода диффузии в агар. Данная статья была написана и согласована при участии всех авторов.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Собин Ф. В., Пулина Н. А., Новикова В. В. Изучение противогрибковой активности экспериментальных мягких лекарственных форм на основе гидразонопроизводного гетариламида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4-1): 43–47. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-43-47](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-43-47)

## Study of Antifungal Activity of Experimental Soft Dosage Form Based on the Hydrazone Derivative of Getarylamide 4-phenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenoic acid

Fedor V. Sobin , Natalya A. Pulina, Valentina V. Novikova

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

✉ Corresponding author: Fedor V. Sobin. E-mail: fff-2005@mail.ru

ORCID: Fedor V. Sobin – <https://orcid.org/0000-0002-8416-6934>; Natalya A. Pulina – <https://orcid.org/0000-0002-0435-0484>; Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>.

Received: 14.10.2022

Revised: 21.11.2022

Published: 27.12.2022

© Собин Ф. В., Пулина Н. А., Новикова В. В., 2022

© Sobin F. V., Pulina N. A., Novikova V. V., 2022

## Abstract

**Introduction.** Recently, there has been a significant increase in fungal infections. The most common is vulvovaginal candidiasis, affecting millions of women worldwide. Resistance is formed to existing antifungal drugs, and they are not devoid of side effects. Previously, we have shown high antimicrobial activity of derivatives of 4-R-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acids. The creation of soft dosage forms based on them and the study of antifungal action is promising.

**Aim.** To develop experimental soft dosage forms based on one of the most active derivatives of 4-R-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acids and to evaluate the effect of the ointment composition on the severity of antifungal action.

**Materials and methods.** As a pharmacologically active component, a hydrazone derivative of 4-phenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acid synthesized by us was used, which has pronounced antifungal activity. 8 experimental soft dosage forms based on hydrophobic and hydrophilic character have been developed. The active substance in a concentration of 1 % was introduced by standard technological methods according to the rules for the manufacture of dermatological ointments. To determine the antifungal activity of the ointments obtained, a three-nesting variant of the agar diffusion method was used. Comparison preparations are 2 % cream "Pimafucin" and 1 % cream "Clotrimazole".

**Results and discussion.** All the studied experimental soft dosage forms showed antifungal effects of varying degrees of severity. The greatest pharmacological effect was found in ointment compositions based on hydrophilic components of sodium-carboxymethylcellulose and polyethylene oxides. Their antifungal effect is comparable or exceeds the effect of comparison drugs.

**Conclusion.** 8 experimental soft dosage forms based on a derivative of 4-phenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acid have been developed. Their antifungal activity has been studied. Two most active samples of experimental ointments were selected for further in-depth study.

**Keywords:** derivatives of 4-R-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acids, antifungal activity, soft dosage form

**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.** Fedor V. Sobin synthesized a pharmacologically active component, selected formulations and manufactured experimental soft dosage forms based on it, took a direct part in writing and correcting the article. Natalya A. Pulina carried out scientific and technological guidance of the research and reviewing the article. Valentina V. Novikova studied the antifungal activity of experimental ointment compositions in relation to a typical strain of *C. albicans* NCTC 885-653 is a three-socket variant of the agar diffusion method. This article was written and agreed upon with the participation of all the authors.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Sobin F. V., Pulina N. A., Novikova V. V. Study of antifungal activity of experimental soft dosage form based on the hydrazone derivative of getarylamide 4-phenyl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acid. *Drug development & registration*. 2022;11(4-1):43-47. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-43-47](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-43-47)

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается значительный рост количества грибковых заболеваний. Это связано со многими факторами, в частности, с частым применением в медицинской практике антибиотиков широкого спектра действия, иммунодепрессантов, цитостатиков и других групп лекарственных средств. Наиболее распространенным проявлением грибковых инфекций является вульвовагинальный кандидоз, поражающий миллионы женщин во всем мире, не зависимо от национальности и социального класса [1–3]. Известно, что в настоящее время частота заболеваемости колеблется от 12 до 67,6 % в популяции, а 70–75 % женщин испытывали вульвовагинальный кандидоз по крайней мере один раз в жизни. Было обнаружено, что это оказывает большое влияние на качество жизни женщин, их самооценку и распорядок дня. Преобладающим возбудителем в 90–95 % случаев является *Candida albicans* [1–6]. Повышение устойчивости патогенных организмов к имеющимся химиотерапевтическим агентам является критической проблемой в проектировании и разработке лекарственных средств, что мотивирует исследователей искать новые соединения, которые могут бороться с микроорганизмами с множественной лекарственной

устойчивостью. В последнее время вызывает большой интерес лечение данных инфекций местными противогрибковыми препаратами. Данный способ введения обладает несколькими уникальным преимуществам по сравнению с пероральным препаратами: высокой терапевтической эффективностью, улучшенной биодоступностью, способностью предотвращать различные системные побочные эффекты [7–8].

Ранее была показана высокая антибактериальная и противогрибковая активность производных 4-R-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислот. Перспективно создание мягких лекарственных форм на их основе за счет сочетания нескольких полезных фармакологических эффектов: антимикробного, противовоспалительного и ранозаживляющего действия [9–11]. Представляло интерес разработать экспериментальные мягкие лекарственные формы на основе одного из наиболее активных производных и оценить влияние состава мазевой композиции на выраженность антифунгального действия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве фармакологически активного компонента была использована субстанция гидразонопроизводного гетариламида 4-фенил-2-гидрокси-4-оксо-

Таблица 1. Состав экспериментальных мягких лекарственных форм

Table 1. Composition of experimental soft dosage forms

№ композиции No. composition	1	2	3	4	5	6	7	8
Действующее вещество ФСГ Active ingredient FSH	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
Вазелин Petrolatum	98,5 %	98,5 %	–	–	–	–	–	–
NaКМЦ NaCMC	–	–	4 %	4 %	–	–	–	–
ПЭО-400 PEO-400	–	–	–	–	78,8 %	78,8 %	–	–
ПЭО-1500 PEO-1500	–	–	–	–	19,7 %	19,7 %	–	–
Коньяковый глюкоманнан Konjac glucomannan	–	–	–	–	–	–	1 %	1 %
Вода очищенная Purified water	–	–	85 %	84,5 %	–	–	96 %	95,5 %
Глицерол Glycerol	–	–	10 %	10 %	0,5 %	–	2 %	2 %
ДМСО DMSO	–	0,5 %	–	0,5 %	–	0,5 %	–	0,5 %
Вазелиновое масло Vaseline oil	0,5 %	–	–	–	–	–	–	–

2-бутеновой кислоты, обладающего выраженной противогрибковой активностью. Целевое соединение было нами ресинтезировано по описанной ранее методике. Доказана его подлинность и структура инструментальными методами анализа. Соединению присвоен условный шифр ФСГ. Синтезированное соединение представляет собой порошкообразное вещество желтого цвета, растворимое в хлороформе, диоксане, ацетоне, диметилсульфоксиде, диметилформамиде, умеренно растворимое в бензоле, ацетонитриле, этиловом спирте и нерастворимое в воде, гексане.

С целью выбора оптимальной мазевой основы было изучено 8 составов на основах гидрофобного и гидрофильного характера, содержащих различные сочетания вазелина (ФС.2.2.0003.15 «Вазелин», ОАО «Самарамедпром», Россия, срок годности 55 месяцев), вазелинового масла (ГОСТ 3164–78, ООО «Компания ЭльГрупп», Россия, срок годности 5 лет), ПЭО-400 (ФС 42-1242-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», Россия, срок хранения 3 года) и ПЭО-1500 (ФС 42-1885-96, ООО «Нефтегазхимкомплект», Россия, срок хранения 3 года), натрий-карбоксиметилцеллюлоза (ТУ 2231-002-50277563-2000, ЗАО «Карбокам-Пермь», Россия, срок годности 1 год), коньякового глюкоманнана (Andy Biotech (Xi'an) Co., Ltd., Китай, срок годности 2 года) и глицерола (ФС.2.2.0006.15 «Глицерин», ОАО «Самарамедпром», Россия, срок годности 5 лет). Действующее вещество вводилось стандартными технологическими способами либо в

виде суспензии с добавлением соответствующей вспомогательной жидкости, либо по типу эмульсии или раствора при растворении активного компонента в ДМСО. Первоначальная концентрация соединения ФСГ составила 1 %, в соответствии с основными референтными препаратами. Полученным мазевым композициям присвоены условные шифры от 1 до 8. Состав и процентные соотношения компонентов экспериментальных мягких лекарственных форм представлены в таблице 1.

Важным показателем мазей является способность биологически активного вещества высвободиться из лекарственной формы, о чем можно судить по результатам исследования его диффузии в агар. Для определения противогрибковой активности полученных мазей в отношении типового штамма *S. albicans* NCTC 885–653 использовали трехгнездный вариант метода диффузии в агар<sup>1</sup>. В чашки Петри, установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, разливали расплавленную питательную среду Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Температура расплавленной среды составляла 48–50 °С. После застывания агара осуществляли посев суточной культуры тест-штамма содержащей 2–5 × 10<sup>6</sup> КОЕ/мл методом газона. С использованием стерильного сверла в толще агара пробивали лунки

<sup>1</sup> Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. 2018. Доступно по: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinicalrecommendations>. Ссылка активна на 21.10.2022..

диаметром 10 мм. Масса образца, вносимого в лунку – 0,1 мл. Затем посе́вы помещали в термостат для инкубирования в течение 22–24 ч при температуре  $37 \pm 1$  °C. Учет результатов противогрибковой активности производили по диаметру зоны задержки роста вокруг лунки.

В качестве препаратов сравнения использовали «Пимафуцин» крем 2%-й (Temmler Italia S.r.L., Италия, серия 21J84/75, срок годности до 09.2025) и «Клотримазол» крем 1%-й (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, S.A., Польша, серия DN3D, срок годности 02.2024). Результаты исследований обработаны статистически и представлены на рисунке 1.

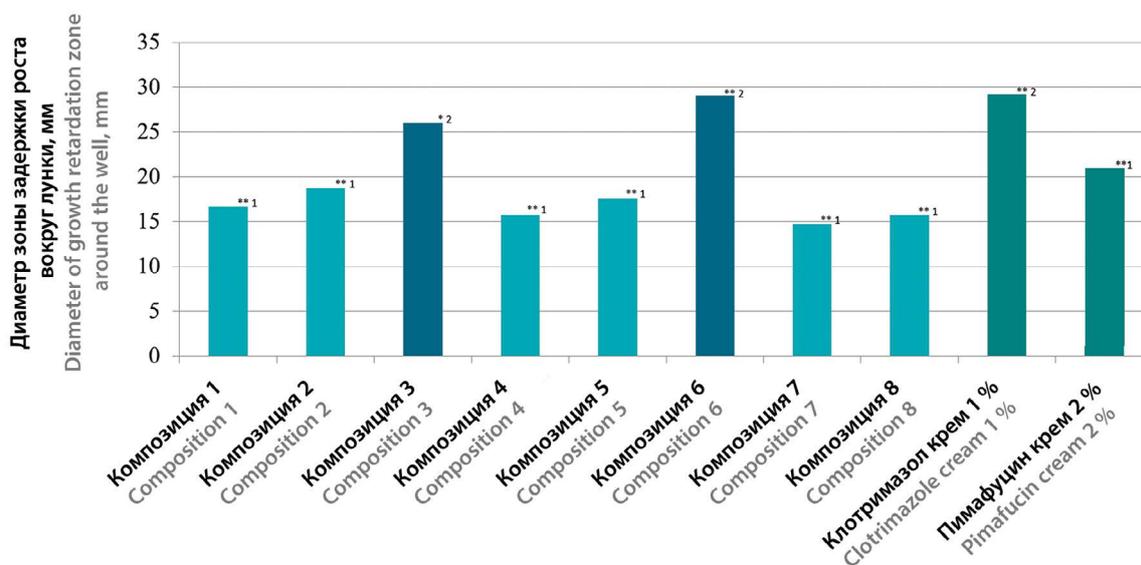
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все изученные экспериментальные мягкие лекарственные формы проявили противогрибковое действие различной степени выраженности. Установлено, что наименьший фармакологический эффект показали образцы на основе коньякового глюкоманнана (№ 7, 8). При этом способ введения действующего вещества не оказал существенного влияния на биологическое действие. Мазевые композиции на основе вазелина (№ 1, 2) показали эффект близкий к показателям «Пимафуцина». Состав № 3 на основе НаКМЦ превышает его активность. Нами отмечено существенное снижение антифунгального эффекта при использовании в качестве

вспомогательного компонента ДМСО (№ 4). Напротив, при переходе к мягким лекарственным формам на основе полиэтиленоксидов, отмечается рост изучаемого действия при введении целевого соединения в виде раствора в ДМСО. Данная композиция легко высвобождает действующее вещество и обеспечивает его высокую биодоступность и выраженный противогрибковый эффект, при этом зона задержки роста микроорганизмов вокруг лунки сопоставима с «Клотримазолом».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые разработаны 8 экспериментальных мягких лекарственных форм на основе гидразонопроизводного гетариламида 4-фенил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновой кислоты. Изучена их противогрибковая активность в отношении типового штамма *C. albicans* NCTC 885-653 трехгнездным вариантом метода диффузии в агар. Выбраны два образца экспериментальных мягких лекарственных форм на гидрофильных основах (ПЭО-400 + ПЭО-1500 + ДМСО; НаКМЦ + глицерол), оказавшие наибольший фармакологический эффект, сопоставимый с препаратами сравнения. Они предложены нами для дальнейшего углубленного изучения с целью подбора оптимальной концентрации действующего вещества, дополнительных вспомогательных веществ и более широкого исследования антимикробного действия.



**Рисунок 1.** Противогрибковая активность экспериментальных мягких лекарственных форм в отношении *C. albicans* NCTC 885-653

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

1 – по сравнению с «Клотримазол» кремом 1%-м; 2 – по сравнению «Пимафуцин» кремом 2%-м

**Figure 1.** Antifungal activity of experimental soft dosage forms against *C. albicans* NCTC 885-653

Note. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

1 – compared with "Clotrimazole" cream 1 %; 2 – compared to "Pimafucin" cream 2 %

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пестрикова Т. Ю., Юрасова Е. А., Котельникова А. В. Вульвовагинальный кандидоз: современный взгляд на проблему. *ПМЖ. Мать и дитя*. 2017;25(26):1965–1970.
2. Disha T., Haque F. Prevalence and Risk Factors of Vulvovaginal Candidosis during Pregnancy: A Review. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2022;2022:6195712. DOI:10.1155/2022/6195712.
3. Donders G. G. G., Ruban K., Donders F., Reybrouck R. Lab-Based Retrospective 10-Year Analysis Shows Seasonal Variation of Vaginal Candida Infection Rates in Belgium. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(3):574. DOI:10.3390/jcm11030574.
4. Sustr V., Foessleitner P., Kiss H., Farr A. Vulvovaginal candidosis: Current concepts, challenges and perspectives. *Journal of Fungi*. 2020;6(4):1–14. DOI:10.3390/jof6040267.
5. Ignjatović A., Arsić-Arsenijević V., Golubović M., Đenić S., Momčilović S., Trajković A., Randelović M., Ćirić V., Otašević S. Recurrent vulvovaginal candidosis and cluster analysis of clinical signs and symptoms: A laboratory-based investigation. *Journal of Fungi*. 2020;6(3):113. DOI: 10.3390/jof6030113.
6. Faria-Gonçalves P., Gaspar C., Oliveira A. S., Palmeira-De-Oliveira R., Gonçalves T., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-De-Oliveira A., Rolo J. Evaluation of overtime phenotypic variation of yeasts in chronic vulvovaginal candidosis cases. *Medical Mycology*. 2021;59(12):1166–1173. DOI: 10.1093/mmy/myab048.
7. Tomás, M., Rolo, J., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira A., Simões S., Katze D. F., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-de-Oliveira R. Sodium bicarbonate gels: a new promising strategy for the treatment of vulvovaginal candidosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;157:105621. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105621.
8. Guo X., Jing T., Li X., Liu Z., Chen Y., Li Y., Xu Y., Gao H. Effects of Boric Acid Gel on Vaginal Candida albicans Infections and the Local Immune System in Mice. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:950215. DOI: 10.3389/fimmu.2022.950215.
9. Pulina N. A., Lipatnikov K. V., Sobin F. V., Dubrovina S. S., Makhmudov R. R. Synthesis and biological activity of 4-aryl-N-(5,6-R-benzo[d]thiazol-2-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enamides. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(8):1618–1622. DOI: 10.1134/s107036321808011x.
10. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Mashkina E. A., Novikova V. V., Makhmudov R. R., Yankin A. N., Danilov S. E., Hvolis E. A., Belonogova V. D., Gulyaev D. K. Synthesis and Antimicrobial Activity of Methyl (2Z)-4-Aryl-2-4-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl]phenylamino-4-oxobut-2-enoates and Their Silver Salts. *Russian Journal of General Chemistry*. 2020;90(5):822–826. DOI:10.1134/S1070363220050102
11. Новикова В. В., Пулина Н. А., Собин Ф. В., Липатников К. В. Противогрибковая активность новых производных 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2020;18(3):225–228. DOI: 10.17816/RCF183225-228.

## REFERENCES

1. Pestrikova T. Yu., Yurasova E. A., Kotelnikova A. V. Vulvovaginal candidiasis: modern look at the problem. *RMJ. Mat' i ditja*. 2017;25(26):1965–1970. (In Russ.)
2. Disha T., Haque F. Prevalence and Risk Factors of Vulvovaginal Candidosis during Pregnancy: A Review. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2022;2022:6195712. DOI:10.1155/2022/6195712.
3. Donders G. G. G., Ruban K., Donders F., Reybrouck R. Lab-Based Retrospective 10-Year Analysis Shows Seasonal Variation of Vaginal Candida Infection Rates in Belgium. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(3):574. DOI:10.3390/jcm11030574.
4. Sustr V., Foessleitner P., Kiss H., Farr A. Vulvovaginal candidosis: Current concepts, challenges and perspectives. *Journal of Fungi*. 2020;6(4):1–14. DOI:10.3390/jof6040267.
5. Ignjatović A., Arsić-Arsenijević V., Golubović M., Đenić S., Momčilović S., Trajković A., Randelović M., Ćirić V., Otašević S. Recurrent vulvovaginal candidosis and cluster analysis of clinical signs and

- symptoms: A laboratory-based investigation. *Journal of Fungi*. 2020;6(3):113. DOI: 10.3390/jof6030113.
6. Faria-Gonçalves P., Gaspar C., Oliveira A. S., Palmeira-De-Oliveira R., Gonçalves T., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-De-Oliveira A., Rolo J. Evaluation of overtime phenotypic variation of yeasts in chronic vulvovaginal candidosis cases. *Medical Mycology*. 2021;59(12):1166–1173. DOI: 10.1093/mmy/myab048.
7. Tomás, M., Rolo, J., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira A., Simões S., Katze D. F., Martinez-de-Oliveira J., Palmeira-de-Oliveira R. Sodium bicarbonate gels: a new promising strategy for the treatment of vulvovaginal candidosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;157:105621. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105621.
8. Guo X., Jing T., Li X., Liu Z., Chen Y., Li Y., Xu Y., Gao H. Effects of Boric Acid Gel on Vaginal Candida albicans Infections and the Local Immune System in Mice. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:950215. DOI: 10.3389/fimmu.2022.950215.
9. Pulina N. A., Lipatnikov K. V., Sobin F. V., Dubrovina S. S., Makhmudov R. R. Synthesis and biological activity of 4-aryl-N-(5,6-R-benzo[d]thiazol-2-yl)-2-hydroxy-4-oxobut-2-enamides. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(8):1618–1622. DOI: 10.1134/s107036321808011x.
10. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Mashkina E. A., Novikova V. V., Makhmudov R. R., Yankin A. N., Danilov S. E., Hvolis E. A., Belonogova V. D., Gulyaev D. K. Synthesis and Antimicrobial Activity of Methyl (2Z)-4-Aryl-2-4-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl]phenylamino-4-oxobut-2-enoates and Their Silver Salts. *Russian Journal of General Chemistry*. 2020;90(5):822–826. DOI:10.1134/S1070363220050102
11. Novikova V. V., Pulina N. A., Sobin F. V., Lipatnikov K. V. Antifungal activity of new derivatives of 4-(het)aryl-2,4-dioxobutanoic acids. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*. 2020;18(3):225–228. DOI: 10.17816/RCF183225-228. (In Russ.)



Оригинальная статья / Research article

## Компонентный состав и противомикробная активность фракций из надземной части льнянки обыкновенной (*Linaria vulgaris* Mill.)

Т. В. Бомбела<sup>1</sup>✉, О. А. Кроткова<sup>1</sup>, Е. Е. Галишевская<sup>1</sup>, А. Г. Анисимова<sup>1</sup>,  
Т. А. Ягонцева<sup>1</sup>, А. В. Агафонцева<sup>1</sup>, В. В. Новикова<sup>1</sup>, А. К. Уэйли<sup>2</sup>,  
А. О. Понкратова<sup>2</sup>, В. Г. Лужанин<sup>1</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 СПбХУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Бомбела Татьяна Владимировна. E-mail: tatyana.bombela@yandex.ru

ORCID: Т. В. Бомбела – <https://orcid.org/0000-0003-0414-0783>; О. А. Кроткова – <https://orcid.org/0000-0001-8724-2149>; Е. Е. Галишевская – <https://orcid.org/0000-0001-9388-333X>; А. Г. Анисимова – <https://orcid.org/0000-0002-0555-6804>; Т. А. Ягонцева – <https://orcid.org/0000-0002-0797-8314>; А. В. Агафонцева – <https://orcid.org/0000-0002-2586-1507>; В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. О. Понкратова – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 08.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Природные биологически активные вещества (БАВ) отличаются различной полярностью, которая обуславливает их физико-химические свойства, в том числе растворимость. Используя растворители различной полярности, можно влиять на спектр извлекаемых из растений БАВ, достигая их разделения по группам, а в дальнейшем добиваясь выделения в индивидуальном виде. В составе БАВ травы *Linaria vulgaris* Mill. – льнянки обыкновенной содержатся как липофильные, так и гидрофильные вещества. Трава *L. vulgaris* широко используется в народной медицине при ангине, конъюнктивите, дерматомикозе, парадонтозе и других заболеваниях, в патогенезе которых существенная роль отведена бактериальным факторам.

**Цель.** Исследовать влияние растворителей различной полярности на компонентный состав извлекаемых БАВ и противомикробную активность фракций из травы *L. vulgaris*.

**Материалы и методы.** Надземная часть *L. Vulgaris*, собранная в фазу цветения – начала плодоношения в июле 2021 году в Пермском крае. Фракции получены методом последовательной исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракции спиртового извлечения из травы *L. vulgaris*: гексаном, дихлорметаном, *n*-бутанолом. Обнаружение БАВ проводили методом ВЭЖХ и планарной хроматографии на бумаге. Антимикробную активность изучали в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

**Результаты и обсуждение.** При использовании растворителей различной полярности из спиртового извлечения *Linaria vulgaris* получены четыре фракции: гексановая, дихлорметановая, бутанольная и водная, отличающиеся компонентным составом БАВ. Количество полифенольных веществ во фракциях увеличивается с увеличением полярности растворителя – гексан (14), дихлорметан (55), бутанол (61). Дихлорметановая и бутанольная фракция имеют схожий состав, представленный полифенольными соединениями и иридоидами. Основными группами соединений данных фракций являются фенолоксиолы и флавоноиды. Иридоиды обнаружены в следовых количествах. В гексановой фракции обнаружено наименьшее количество веществ, полностью отсутствуют иридоиды, в следовых количествах установлены фенолоксиолы. Водная фракция характеризуется содержанием всего комплекса БАВ. Наиболее высокая антибактериальная активность в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* установлена для водной фракции, тогда как наиболее выраженная противогрибковая активность характерна для гексановой и дихлорметановой фракции.

**Заключение.** При использовании растворителей различной полярности из спиртового извлечения *L. vulgaris* получены фракции, содержащие разнообразный набор БАВ. Разнополярные фракции *L. vulgaris* обладают антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, а также патогенных грибов из рода *Candida*.

**Ключевые слова:** *Linaria vulgaris*, ВЭЖХ-анализ, антибактериальная и противогрибковая активность

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

**Вклад авторов.** Т. В. Бомбела, О. А. Кроткова, Е. Е. Галишевская, А. Г. Анисимова, Т. А. Ягонцева, А. В. Агафонцева, В. В. Новикова, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. В. Г. Лужанин осуществлял руководство научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Бомбела Т. В., Кроткова О. А., Галишевская Е. Е., Анисимова А. Г., Ягонцева Т. А., Агафонцева А. В., Новикова В. В., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Лужанин В. Г. Компонентный состав и противомикробная активность фракций из надземной части льнянки обыкновенной (*Linaria vulgaris* Mill.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):48–56. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-48-56](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-48-56)

© Бомбела Т. В., Кроткова О. А., Галишевская Е. Е., Анисимова А. Г., Ягонцева Т. А., Агафонцева А. В., Новикова В. В., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Лужанин В. Г., 2022

© Bombela T. V., Krotkova O. A., Galishevskaya E. E., Anisimova A. G., Yagontseva T. A., Agafontseva A. V., Novikova V. V., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Luzhanin V. G., 2022

## Component Composition and Antimicrobial Activity of Fractions from the Aerial Part of Common Toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.)

Tatyana V. Bombela<sup>1</sup>✉, Olga A. Krotkova<sup>1</sup>, Elena E. Galishevskaya<sup>1</sup>, Alevtina G. Anisimova<sup>1</sup>, Tatiana A. Yagontseva<sup>1</sup>, Anastasiia V. Agafontseva<sup>1</sup>, Valentina V. Novikova<sup>1</sup>, Andrei K. Whaley<sup>2</sup>, Anastasiia O. Ponkratova<sup>2</sup>, Vladimir G. Luzhanin<sup>1</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: Tatyana V. Bombela. E-mail: tatyana.bombela@yandex.ru

ORCID: Tatyana V. Bombela – <https://orcid.org/0000-0003-0414-0783>; Olga A. Krotkova – <https://orcid.org/0000-0001-8724-2149>; Elena E. Galishevskaya – <https://orcid.org/0000-0001-9388-333X>; Alevtina G. Anisimova – <https://orcid.org/0000-0002-0555-6804>; Tatiana A. Yagontseva – <https://orcid.org/0000-0002-0797-8314>; Anastasiia V. Agafontseva – <https://orcid.org/0000-0002-2586-1507>; Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Andrei K. Whaley – <http://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Anastasiia O. Ponkratova – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Received: 14.10.2022

Revised: 08.12.2022

Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** Natural biologically active substances (BAS) are distinguished by different polarity, which determines their physicochemical properties, including solubility. When using solvents of different polarity, it is possible to influence the spectrum of BAS extracted from plants, achieving their division into groups, and further achieving isolation in an individual form. The aerial part of *Linaria vulgaris* Mill. (common toadflax) contains both lipophilic and hydrophilic substances. The herb *L. vulgaris* is widely used in folk medicine for treatment of angina, conjunctivitis, dermatomycosis, periodontitis and other diseases. Bacterial factors play an important role in the pathogenesis of these diseases.

**Aim.** To study the effect of solvents of different polarity on the component composition of extracted BAS and to study the antimicrobial activity of fractions from the herb *L. vulgaris*.

**Materials and methods.** The aerial part of *L. vulgaris* was collected at the flowering stage – at the beginning of fruiting stage in July 2021 in the Perm region. The fractions were obtained by sequential exhaustive liquid-liquid extraction of an alcoholic extract from the herb *L. vulgaris* with hexane, dichloromethane, and *n*-butanol. Detection of BAS was carried out by HPLC and planar chromatography on paper. Antimicrobial activity was studied against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

**Results and discussion.** Using solvents of different polarity four fractions were obtained from the alcohol extract of *L. vulgaris*: hexane, dichloromethane, *n*-butanol and water. These fractions have differences in the composition of BAS. The number of polyphenolic substances in the fractions increases with increasing of solvent polarity: hexane (14), dichloromethane (55), butanol (61). The dichloromethane and *n*-butanol fractions have a similar composition, represented by polyphenolic compounds and iridoids. The main groups of compounds in these fractions are phenolic acids and flavonoids. Iridoids are found in trace amounts. In the hexane fraction, the smallest number of substances was found, iridoids are completely absent, and phenolic acids were found in trace amounts. The water fraction is characterized by the content of the entire BAS complex. The highest antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was found for the aqueous fraction, while the highest antifungal activity was found for the hexane and dichloromethane fractions.

**Conclusion.** Using solvents of different polarity, fractions containing a diverse set of BAS were obtained from the alcoholic extract of *L. vulgaris*. Fractions exhibiting different polarities from *L. vulgaris* have antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, as well as against pathogenic fungi from the genus *Candida*.

**Keywords:** *Linaria vulgaris*, HPLC, antibacterial and antifungal 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.** Tatyana V. Bombela, Olga A. Krotkova, Elena E. Galishevskaya, Alevtina G. Anisimova, Tatiana A. Yagontseva, Anastasiia V. Agafontseva, Valentina V. Novikova, Andrei K. Waley, Anastasiia O. Ponkratova performed the experimental part and processing of the results. Vladimir G. Luzhanin supervised the scientific research. All authors took part in the discussion of the results.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Bombela T. V., Krotkova O. A., Galishevskaya E. E., Anisimova A. G., Yagontseva T. A., Agafontseva A. V., Novikova V. V., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Luzhanin V. G. Component composition and antimicrobial activity of fractions from the aerial part of common toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.). *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):48–56. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-48-56](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-48-56)

## ВВЕДЕНИЕ

*Linaria vulgaris* Mill. (льнянка обыкновенная) – многолетнее травянистое растение, которое распространено в Европе, Азии, Западной Сибири, на Дальнем Востоке [1, 2]. Согласно филогенетической системе классификации цветковых растений, разработанной А. Л. Тахтаджаном, род *Linaria* принадлежит к семейству *Scrophulariaceae* – норичниковые [2, 3], одна-

ко, на основании данных о последовательности нуклеиновых кислот, широко используемых в настоящее время в молекулярно-филогенетической систематике, данный род отнесен к семейству *Plantaginaeae* – подорожниковые [4, 5].

Состав биологически активных соединений травы *L. vulgaris* разнообразен и представлен как неполярными (липофильными), так и полярными (гидрофиль-

ными) веществами. Среди липофильных соединений обнаружены жиры, жирные кислоты [6–9], а гидрофильные соединения представлены дубильными веществами, фенолокислотами, флавоноидами, иридоидами [8, 9].

Природные биологически активные вещества (БАВ) отличаются различной полярностью, которая обуславливает их физико-химические свойства, в том числе растворимость. Используя растворители различной полярности, можно влиять на спектр извлекаемых веществ, достигая их разделения по группам БАВ, а в дальнейшем выделять в индивидуальном виде. Биологическая активность суммы БАВ и выделенных соединений может существенно различаться и быть разнонаправленной [10–13]. Экспериментально установлено, что линариин, выделенный из травы *L. vulgaris*, оказывает гипотензивное действие [14], в то время как сумма флавоноидов из травы *L. vulgaris*, в составе которой присутствует линариин, повышает артериальное давление, увеличивает амплитуду сердечных сокращений и замедляет ритм [15].

Трава *L. vulgaris* широко используется в народной медицине при заболеваниях глаз (конъюнктивит, блефарит), горла (ангина) и кожи (дерматит, дерматомикоз, сыпь, экзема, псориаз, фурункулез) [16, 17]. Настой травы льнянки обыкновенной в стоматологии используется в виде аппликаций и полосканий при абсцедирующей форме парадонтоза и грибковых поражениях слизистой оболочки полости рта [18].

Экспериментально установлено, что водный экстракт *L. vulgaris* проявляет антибактериальную активность [17], фунгицидное и противовоспалительное действие [18]. Спиртовой экстракт *L. corifolia* обладает антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий, а также оказывает выраженное действие против кислотоустойчивой бактерии *Mycobacterium smegmatis*, в сравнении с цефотоксимом (СТХ30). Кроме того, спиртовые экстракты листьев, цветков, стеблей и корней проявляли противогрибковое действие, в отношении *Kluyveromyces fragilis* [19].

Известно, что существенную роль в патогенезе ряда офтальмологических, дерматологических и стоматологических заболеваний играют бактериальные факторы, а именно патогенные бактерии и грибы. Поиск и создание противомикробных лекарственных средств растительного происхождения является в настоящее время актуальным направлением медицины и фармации, данной проблеме посвящен ряд исследовательских работ [20–23].

Таким образом, **целью настоящего исследования** является изучение влияния растворителей различной полярности на компонентный состав извлекаемых БАВ и изучение противомикробной активности полученных фракций из травы *L. vulgaris*, в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Надземная часть *Linaria vulgaris*, собранная в фазу цветения – начала плодоношения в июле 2021 году в Пермском крае (Краснокамский район, п. Оверята), была высушена воздушно-теневым способом, измельчена и просеяна через сито с диаметром отверстий 2 мм.

Навеску сырья (500,0) подвергали многократной экстракции 96%-м этиловым спиртом (5000 мл) в течение 24 часов при комнатной температуре. Полученные извлечения объединяли, упаривали при 60 °С, до приблизительного объема 200 мл, после чего полученное извлечение подвергалось последовательной исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракцией [24]. Первый этап проводился равным количеством гексана (фракция 1), до его полного обесцвечивания, затем для продолжения жидкость-жидкостной экстракции к спиртовому извлечению добавляли 50 мл воды очищенной. Второй этап осуществляли аналогично с равным количеством дихлорметана (фракция 2). В заключении жидкость-жидкостная экстракция проводилась с равным количеством бутанола (фракция 3). Остаточную водную (фракция 4) и три полученных фракции выпаривали до приблизительного объема 100 мл. Для изучения выхода извлекаемых веществ, часть гексановой, дихлорметановой, бутанольной и водной фракции, достаточной для анализа (10 мл), выпаривали досуха, остаток взвешивали.

Предварительный анализ компонентного состава фенольных соединений и иридоидов в полученных фракциях изучали методом восходящей одномерной бумажной хроматографии [в системе *n*-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:2)]. Для идентификации фенольных соединений хроматограммы просматривали в УФсвете, до и после обработки парами аммиака, а также после проявления хромогенными реактивами.

Кроме того, обнаружение БАВ во фракциях проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенный диодноматричным 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]. Объем вводимой пробы 10 мкл.

В качестве стандартных соединений использовали стандарты образцы (СО) *p*-кумаровой кислоты, синаповой, сиреневой, кофейной, ванилиновой, феруловой, розмариновой, хлорогеновой и гентизиновой, апигенина, аукубин, линарин, линариин и этилгаллат (Sigma-Aldrich, США), а также выделенные индивидуальные соединения, структура которых была установлена в ранее проведенных исследованиях: кемпферол [25], эпикатехин [26].

Идентификация соединений производилась по сопоставлению времени удерживания и УФ-спектров пиков во фракциях, с теми же параметрами стандартных образцов и ранее выделенных соединений.

Противогрибковую и антибактериальную активность соединений определяли микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах [27] в двух повторях. Скрининг противомикробной активности осуществляли в отношении референтных (типовых) штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653. Концентрация исследуемых соединений в первой лунке ряда разведений в питательной среде составила 5000,0 мкг/мл. Для определения антибактериальной активности использовали питательный бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск), для определения противогрибковой активности – бульон Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Для приготовления взвеси дрожжевых культур применяли двухсуточные культуры, выращенные на агаре Сабуро. Для определения антибактериальной активности использовали суточные культуры, выращенные на питательном агаре. Концентрация микробных клеток в опыте составила  $2-5 \times 10^5$  КОЕ/мл. В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы инкубировали в термостате при температу-

ре  $35 \pm 2$  °С. Оценку роста микроорганизмов проводили визуально через 20–24 ч инкубирования. В качестве значения МИК (минимальной ингибирующей концентрации) принимали концентрацию соединения в последней прозрачной лунке серии разведения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика использованных растворителей и полученных фракций приведена в таблице 1. Из полученных данных следует, что полярность растворителей оказывает влияние на количественный выход извлекаемых веществ из травы льнянки обыкновенной. С увеличением полярности растворителя выход веществ увеличивается.

На основании результатов хроматографического анализа в исследуемых фракциях обнаружено более шестидесяти природных соединений (таблицы 2, 3). Количество полифенольных веществ во фракциях увеличивается с увеличением полярности растворителя – гексан (14), дихлорметан (55), бутанол (61). При идентификации вещества отнесены к трем группам соединений – фенолоксилоты, флавоноиды и иридоиды.

Установлено, что исследуемые группы БАВ извлекаются различными растворителями неравномерно, характер их распределения зависит, в том числе и от полярности. Дихлорметановая и бутанольная фракция имеют схожий состав, представленный полифенольными соединениями и иридоидами.

**Таблица 1.** Характеристика растворителей и фракций из травы *Linaria vulgaris*

**Table 1.** Performance of solvents and fractions from the herb *Linaria vulgaris*

№	Фракция Fraction	Характеристика растворителя Performance of solvent			Характеристика фракции Performance of fractions	Выход веществ, % Substance yield, %
		Растворитель Solvent	Дипольный момент Dipole moment	Диэлектрическая постоянная Dielectric constant		
1	Гексановая Hexane	Гексан Hexane	0	1,90	Вязкая жидкость темно-зеленого цвета, с характерным запахом Dark green viscous liquid with a characteristic odor	0,6
2	Дихлорметановая Dichloromethane	Дихлорметан Dichloromethane	1,62	9,08	Жидкость темно-коричневого цвета с кристаллообразными включениями белого цвета, с характерным запахом Dark brown liquid with white crystalline inclusions, with a characteristic odor	1,4
3	Бутанольная Butanol	n-Бутанол n-Butanol	1,66	17,80	Двухфазная среда: верхняя фаза – светло-коричневая жидкость, нижняя – рыхлый творожистый осадок оранжевого цвета. Имеет характерный запах бутанола Two-phase medium: the upper phase is a light-brown liquid, the lower one is a friable cheesy orange sediment. It has a characteristic smell of butanol	5,3
4	Водная Water	Вода Water	1,85	80,0	Жидкость темно-бурого цвета с кристаллообразными включениями белого цвета Dark brown liquid with white crystalline inclusions	5,8

Таблица 2. Люминесцентно-хроматографическая характеристика БАВ фракций из травы *Linaria vulgaris*  
Table 2. Luminescent-chromatographic performance of BAS of fractions from the herb *Linaria vulgaris*

Соединение Compound	Значение $R_f$ БУВ 4:1:2 Value $R_f$ BAW 4:1:2	Окраска Stain			Реактив Гепфера Geffner reagent	Фракции Fractions				Стандартные соединения (значения $R_f$ ) Standard substances ( $R_f$ )	
		УФ-свет UV light	УФ + $NH_3$ UV + $NH_3$	$AlCl_3$ , 5% $AlCl_3$ , 5%		1	2	3	4		
Полифенольные соединения Polyphenolic compounds											
1	0,38	бледно-голубая pale blue	ярко-голубая bright blue	-	коричневая brown	-	-	-	-	+	
2	0,45	голубая blue	ярко-голубая bright blue	-	коричневая brown	-	-	-	-	+	
3	0,78	голубая blue	-	-	коричневая brown	-	+	-	-	-	Феруловая кислота (0,78) Ferulic acid (0,78)
4	0,22	фиолетовая purple	фиолетовая purple	желтая yellow	-	-	-	-	-	+	
5	0,55	бледно-фиолетовая pale purple	фиолетовая purple	светло-желтая light yellow	-	-	+	+	+	+	Линарин (0,57) Linarin (0,57)
6	0,62	фиолетовая purple	ярко-фиолетовая bright purple	желтая yellow	-	-	+	+	+	+	
7	0,66	фиолетовая purple	фиолетовая purple	желтая yellow	-	-	+	+	+	-	
8	0,68	фиолетовая purple	фиолетовая purple	желтая yellow	-	-	-	-	-	-	Линарин (0,68) Linarin (0,68)
9	0,75	темно-фиолетовая dark purple	темно-фиолетовая dark purple	желтая yellow	-	-	+	+	+	-	
10	0,83	бледно-фиолетовая pale purple	фиолетовая purple	желтая yellow	-	-	-	+	+	-	Апигенин (0,84) Apigenin (0,84)

		Иридоиды Iridoids											
Соединение Compound	Значение R <sub>y</sub> БУВ 4:1:2 Value R <sub>y</sub> BAW 4:1:2	Окраска Stain						Фракции Fractions				Стандартные соединения (значение R <sub>y</sub> ) Standard substances (R <sub>y</sub> )	
		Реактив Бэкона – Эдельмана Bacon – Edelman reagent		Реактив Штала Stahl reagent		Реактив Трим – Хилла Trim – Hill reagent		1	2	3	4		
		Видимый Visible light	УФ-свет UV light	Видимый Visible light	УФ-свет UV light	Видимый Visible light	УФ-свет UV light	Видимый Visible light	УФ-свет UV light	сл. sl.			
1	0,12	коричневая brown	ярко-коричневая bright brown	синяя blue	ярко-синяя bright blue	бледно-желтая pale yellow	бледно-голубая pale blue	-	-	-	+		
2	0,19	коричневая brown	ярко-коричневая bright brown	-	-	-	-	-	-	-	+		
3	0,26	коричневая brown	ярко-коричневая bright brown	сиреневая lilac	ярко-сиреневая bright lilac	бледно-желтая pale yellow	бледно-голубая pale blue	-	-	-	+		
4	0,34	бледно-коричневая pale brown	коричневая brown	бледно-синяя pale blue	бледно-синяя pale blue	-	-	-	-	-	+		
5	0,35	бледно-коричневая pale brown	коричневая brown	бледно-синяя pale blue	бледно-синяя pale blue	-	-	сл. sl.	сл. sl.	-	-		
6	0,42	-	-	сине-зеленая blue-green	бледно-синяя pale blue	бледно-синяя pale blue	бледно-синяя pale blue	-	-	сл. sl.	+	Аукубин (0,41) Aucubin (0,41)	

Таблица 3. Полифенольные соединения фракций из травы *Linaria vulgaris*

Table 3. Polyphenolic compounds of fractions from the herb *Linaria vulgaris*

№	Стандартные соединения Standard substances	Время удерживания, мин Retention time, min	УФ-спектры, $\lambda_{\max}$ , нм UV spectrum, $\lambda_{\max}$ , nm	Номер фракции Number of fraction			
				1	2	3	4
<i>Фенолокислоты</i> <i>Phenolic acids</i>							
1	<i>p</i> -Кумаровая кислота <i>p</i> -Coumaric acid	18,75	275 пл, 311 275 pl, 311	–*	+*	+	сл. sl.
2	Синаповая кислота Synapic acid	19,85	328	–	+	+	сл. sl.
3	Сиреневая кислота Syringic acid	17,06	267, 294	–	сл. sl.	+	сл. sl.
4	Кофейная кислота Caffeic acid	16,4	287 пл, 324 287 pl, 324	–	сл. sl.	+	–
5	Ванилиновая кислота Vanillic acid	16,31	267, 294	–	+	+	–
6	Феруловая кислота Ferulic acid	19,83	280 пл, 323 280 pl, 323	сл. sl.	+	+	–
7	Розмариновая кислота Rosmarinic acid	21,48	280 пл, 329 280 pl, 329	сл. sl.	+	+	–
8	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid	15,58	282 пл, 328 282 pl, 328	–	–	+	сл. sl.
9	Гентизиновая кислота Gentisic acid	15,81	333			–	+
<i>Флавоноиды</i> <i>Flavonoids</i>							
10	Кемпферол Kaempferol	20,08	265, 347	–	+	+	+
11	Апигенин Apigenin	25,99	267, 335	–	+	+	–
12	Эпикатехин/катехин Epicatechin/catechin	15,26	279	–	–	–	+
13	Этилгаллат Ethylgallate	18,68	272	–	–	–	+
Всего обнаружено соединений: Total compounds found:				14	55	61	39
Идентифицировано: Identified:				2	9	10	8

**Примечание.** \* «+» – наличие соединений; «–» – отсутствие соединений.

**Note.** \* "+" – the presence of connections; "-" – no connections.

В их составе обнаружено более пятидесяти компонентов, из которых идентифицировано десять. Основными группами соединений, данных фракций являются фенолокислоты и флавоноиды. Иридоиды обнаружены в следовых количествах. Из группы фенолокислот идентифицированы ванилиновая, феруловая, розмариновая, *p*-кумаровая, синаповая, сиреневая, кофейная и хлорогеновая кислоты; из флавоноидов – апигенин, кемпферол, линарин и линариин.

В гексановой фракции обнаружено наименьшее количество веществ, полностью отсутствуют иридоиды, в следовых количествах установлены и идентифицированы феруловая и розмариновая кислоты, а также идентифицированы пики веществ относящиеся к пигментам (хлорофилл).

Водная фракция характеризуется содержанием всего комплекса установленных БАВ. Обнаружено более тридцати веществ из группы полифенолов и пять веществ иридоидной природы. На основании спектральных данных и в сравнении с референтными образцами идентифицированы гентизиновая кислота, катехин, этилгаллат, аукубин. Синаповая, *p*-кумаровая, сиреневая, хлорогеновая кислоты обнаружены в следовых количествах.

Установлено, что антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов обладают исследованные фракции (таблица 4). С увеличением полярности растворителя антимикробная активность в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* усиливается, в ряду гексан –

Таблица 4. Антимикробная активность фракций из травы *Linaria vulgaris*

Table 4. Antimicrobial activity of fractions from the herb *Linaria vulgaris*

№	Фракции Fraction	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл Minimum inhibitory concentration, µg/mL		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	Гексановая Hexane	2500/2500	2500/2500	625/625
2	Дихлорметановая Dichloromethane	1250/625	2500/2500	625/625
3	Бутанольная Butanol	625/312	1250/1250	2500/1250
4	Водная Water	312/312	625/625	2500/1250

дихлорметан – бутанол – вода. Наиболее высокая антибактериальная активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов установлена для водной фракции.

Антибактериальная активность водной фракции, вероятно объясняется наличием в ней веществ гидрофильной природы – иридоидов, которые установлены в водной фракции в количестве шести соединений, в отличие от других фракций. Известно, что иридоиды оказывают антимикробное действие [28].

Анализируя влияние полученных фракций на противогрибковую активность установлено, что наиболее выраженная противогрибковая активность в отношении *Candida albicans* характерна для гексановой и дихлорметановой фракции. Увеличение полярности растворителя не приводит к существенному ее изменению.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании растворителей различной полярности из спиртового извлечения *Linaria vulgaris*, получены четыре фракции: гексановая, дихлорметановая, бутанольная и водная, отличающиеся разнообразным набором биологически активных компонентов. Дихлорметановая и бутанольная фракция имеют схожий состав, представленный полифенольными соединениями и иридоидами. В гексановой фракции обнаружено наименьшее количество веществ, полностью отсутствуют иридоиды. Водная фракция характеризуется содержанием всего комплекса БАВ.

Разнополярные фракции *Linaria vulgaris* обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Escherichia coli* микроорганизмов, а также патогенных грибов из рода *Candida*. Наиболее высокая антибактериальная активность в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* установлена для водной фракции, тогда как наиболее выраженная противогрибковая активность характерна для гексановой и дихлорметановой фракции.

## ЛИТЕРАТУРА

- Chater A. O., Valdes B., Webb D. A. *Linaria* Mill. Flora Europaea. Cambridge. 1972;3:226–236.
- Флора Европейской части СССР. Л.: Наука; 1981. 380 с.
- Takhtajan A. L. Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*). *The Botanical Review*; 1980;3(46):225–359.
- An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical journal of the Linnean Society*. 2003;4(141):399–436.
- Shehata A. A., Loutfy M. H. A. On the Taxonomy of Plantaginaceae Juss. *Sensu Lato*: evidence from SEM of the Seed Coat. *Turkish journal of botany*; 2006;2(30):71–84.
- Петриченко В. М. Состав высших жирных кислот масла семян некоторых видов сем. *Scrophulariaceae*. *Растительные ресурсы*. 2006;42(4):49–55.
- Hua H., Li X., Xing S. E., Pei Y. H. Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 2005;40:653–656.
- Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F., Benayache S. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (*Scrophulariaceae*). *Natural Product Research*. 2015;29(17):1589–1613, DOI: 10.1080/14786419.2014.999243.
- Lahloub M F. Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.) Dil. *Mansoura J Pharm Sci*. 1992;8:78–95.
- Kuang W., Zhang X., Lan Z. Flavonoids extracted from *Linaria vulgaris* protect against hyperlipidemia and hepatic steatosis induced by western-type diet in mice. *Archives of Pharmacol Research*. 2018;41:1190–1198. DOI: 10.1007/s12272-017-0941-y.
- Botalova A., Bombela T., Zubov P., Segal M., Korkotian E. The flavonoid acetylpectolarin counteracts the effects of low ethanol on spontaneous network activity in hippocampal cultures. *Journal of ethnopharmacology*. 2019;229:22–28. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.040.
- Ma C., Higashi N., Ishiguro K., Zhao Y., Zhang L., Zhao C., Cheng M., Oku H. Allergy-preventive effects of linarinic acid and its tetrahydropyrrolo[2,1-b]quinazoline derivatives isolated from *Linaria vulgaris*. *Journal of Natural Medicines*. 2018;72(2):582–587. DOI: 10.1007/s11418-018-1187-9.
- Zhang Y., Wan C., Song Z., Meng W., Wang S., Lan Z. Pectolarinigenin reduces the expression of sterol regulatory element-binding proteins and cellular lipid levels. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2022;86(9):1220–1230. DOI: 10.1093/bbb/zbac095.
- Рабинович М. И. Лекарственные растения в ветеринарной практике. М.: Агропромиздат; 1987. 156 с.
- Рабинович М. И. Сердечно-сосудистое действие суммы флавоноидов льнянки обыкновенной. Материалы X научной конференции по фармакологии. 2 часть. Москва. 1966. С. 94–95.
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Caprifoliaceae – Plantaginaceae. Л.: Наука; 1990. 328 с.
- Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб., М: Товарищество научных изданий КМК; 2012.

18. Марченко А. И., Баранюк А. И., Левицкая Е. В., Соколовская Е. П. Лекарственные растения в стоматологии. Кишинев: Штиинца; 1981. 192 с.
19. Gonuz A., Dujger B., Kargioglu M. The morphological, anatomical properties and antimicrobial activity of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey. *Pak J Biol Sci.* 2005;8:220–226.
20. 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.
21. Андреева И. С. Сравнительная оценка антимикробной активности некоторых перспективных лекарственных растений. Растительный мир Азиатской России. *Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН.* 2018;1:91–99.
22. Nafis A., Saad F. E., Khalloufi F. E., Kasrati A., Abbad A., Mezrioui N., Oudra B., Vasconcelos V., Hassani L. New insight into antimicrobial activities of *Linaria ventricosa* essential oil and its synergetic effect with conventional antibiotics. *Archives of microbiology.* 2021;203(7):4361–4366. DOI: 10.1007/s00203-021-02391-7.
23. Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews.* 2019;18:241–272. DOI: 10.1007/s11101-018-9591-z.
24. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
25. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*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.
26. 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 морозники обыкновенной (*Rubus chamaemorus* L.). *Химико-фармацевтический журнал.* 2021;55(3):22–27. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-3-22-27.
27. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
28. Гусев Н. Ф., Немерешина О. Н. Бактериостатическая активность иридоидов вероник Предуралья. *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина.* 2012;10(5):73–78.
10. Kuang W., Zhang X., Lan Z. Flavonoids extracted from *Linaria vulgaris* protect against hyperlipidemia and hepatic steatosis induced by western-type diet in mice. *Archives of Pharmacol Research.* 2018;41:1190–1198. DOI: 10.1007/s12272-017-0941-y.
11. Botalova A., Bombela T., Zubov P., Segal M., Korkotian E. The flavonoid acetylpectolarin counteracts the effects of low ethanol on spontaneous network activity in hippocampal cultures. *Journal of ethnopharmacology.* 2019;229:22–28. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.040.
12. Ma C., Higashi N., Ishiguro K., Zhao Y., Zhang L., Zhao C., Cheng M., Oku H. Allergy-preventive effects of linarinic acid and its tetrahydropyrrolo[2,1-b]quinazoline derivatives isolated from *Linaria vulgaris*. *Journal of Natural Medicines.* 2018;72(2):582–587. DOI: 10.1007/s11418-018-1187-9.
13. Zhang Y., Wan C., Song Z., Meng W., Wang S., Lan Z. Pectolarinigenin reduces the expression of sterol regulatory element-binding proteins and cellular lipid levels. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 2022;86(9):1220–1230. DOI: 10.1093/bbb/zbac095.
14. Rabinovich M. I. Medicinal plants in veterinary practice. Moscow: Agropromizdat. 1987. 156 p. (In Russ.)
15. Rabinovich M. I. Cardiovascular effect of the sum of flavonoids of toadflax. Materials of the X scientific conference on pharmacology. 2 part. Moscow. 1966. P. 94–95. (In Russ.)
16. Plant resources of the USSR: Flowering plants, their chemical composition, use. Families Caprifoliaceae – Plantaginaceae. Leningrad: Nauka; 1990. 328 p. (In Russ.)
17. Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their composition and biological activity. St. Petersburg, Moscow: Tovarishestvo nauchnyh izdanij KMK; 2012. (In Russ.)
18. Marchenko A. I., Baranyuk A. I., Levitskaya E. V., Sokolovskaya E. P. Medicinal plants in dentistry. Kishinev: Shtiintsa; 1981. 192 p. (In Russ.)
19. Gonuz A., Dujger B., Kargioglu M. The morphological, anatomical properties and antimicrobial activity of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Scrophulariaceae) in Turkey. *Pak J Biol Sci.* 2005;8:220–226.
20. 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.
21. Andreeva I. S. Comparative evaluation of antimicrobial activity of some promising medicinal plants. Flora of Asian Russia. *Vestnik Central'nogo sibirskogo botanicheskogo sada SO RAN.* 2018;1:91–99. (In Russ.)
22. Nafis A., Saad F. E., Khalloufi F. E., Kasrati A., Abbad A., Mezrioui N., Oudra B., Vasconcelos V., Hassani L. New insight into antimicrobial activities of *Linaria ventricosa* essential oil and its synergetic effect with conventional antibiotics. *Archives of microbiology.* 2021;203(7):4361–4366. DOI: 10.1007/s00203-021-02391-7.
23. Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews.* 2019;18:241–272. DOI: 10.1007/s11101-018-9591-z.
24. 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.
25. 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.
26. 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 secondary metabolites of polyphenolic nature in the leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal.* 2021;55(3):22–27. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-3-22-27.
27. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
28. Gusev N. F., Nemereshina O. N. Bacteriostatic activity of iridoids of speedwells of Cis-Urals. *Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya medicina;* 2012;10(5):73–78. (In Russ.)

## REFERENCES

1. Chater A. O., Valdes B., Webb D. A. *Linaria* Mill. *Flora Europaea.* Cambridge. 1972;3:226–236.
2. Flora of the European part of the USSR. Leningrad: Nauka; 1981. 380 p. (In Russ.)
3. Takhtajan A. L. Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*). *The Botanical Review;* 1980;3(46):225–359.
4. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical journal of the Linnean Society.* 2003;4(141):399–436.
5. Shehata A. A., Loutfy M. H. A. On the Taxonomy of Plantaginaceae Juss. Senu Lato: evidence from SEM of the Seed Coat. *Turkish journal of botany;* 2006;2(30):71–84.
6. Petrichenko V. M. The composition of higher fatty acids in seed oil of some species of the family *Scrophulariaceae*. *Rastitel'nye resursy.* 2006;42(4):49–55. (In Russ.)
7. Hua H., Li X., Xing S. E., Pei Y. H. Chemical constituents of *Linaria vulgaris*. *Chinese Pharmaceutical Journal.* 2005;40:653–656.
8. Cheriet T., Mancini I., Seghiri R., Benayache F., Benayache S. Chemical constituents and biological activities of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Natural Product Research.* 2015;29(17):1589–1613. DOI: 10.1080/14786419.2014.999243.
9. Lahloub M. F. Flavonoid, phenylpropanoid and iridoid glycosides of *Linaria haelava* (Forssk.) Dil. *Mansoura J Pharm Sci.* 1992;8:78–95.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-57-63](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-57-63)  
УДК 615.451.16



Оригинальная статья / Research article

## Определение фитотехнологических параметров экстракта густого персика обыкновенного (*Persica vulgaris*) листьев

Е. И. Молохова✉, Л. В. Иванцова, В. Д. Белоногова

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

✉ Контактное лицо: Молохова Елена И. E-mail: profmol17@gmail.com

ORCID: Е. И. Молохова – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>; Л. В. Иванцова – <https://orcid.org/0000-0001-8095-3722>; В. Д. Белоногова – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 21.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Листья персика обыкновенного (*Persica vulgaris*), содержащие большое количество биологически активных веществ, включая флавоноиды, рассматриваются в качестве перспективного растительного источника для получения экстракционных препаратов.

**Цель.** Установление влияния фитотехнологических параметров на эффективность выделения комплекса биологически активных веществ из персика обыкновенного листьев.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись образцы высушенных листьев культивируемого дерева персика обыкновенного – *Persica vulgaris* Mill. (сем. розоцветных – *Rosaceae*), собранных в период вегетации (в конце августа). В работе исследованы основные технологические параметры растительного сырья: средний размер частиц и фракционный состав, объемные характеристики удельной, объемной и насыпной масс, показатели пористости, порозности и свободный объем слоя сырья, а также коэффициент поглощения экстрагента.

**Результаты и обсуждение.** Полученные значения фракционного состава и объемные характеристики указывают на целесообразность использования при экстрагировании растительного сырья метода мацерации. Проведенные экспериментальные исследования по подбору оптимальных режимов выделения суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев (экстрагент, температура экстракции, продолжительность экстракции, степень измельчения сырья, гидромодуль) обеспечили высокий выход комплекса БАВ в экстракт.

**Заключение.** В результате исследования установлены фитотехнологические параметры для персика обыкновенного листьев, обоснован рациональный метод экстрагирования – мацерация при нагревании с периодическим перемешиванием и подобраны факторы, обеспечивающие максимальный выход суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев: мацерация при температуре 70 °С в течение 40 мин, экстрагент – спирт этиловый раствор 70 %, степень измельчения сырья – 2 мм, соотношение сырье : экстрагент (1 : 10).

**Ключевые слова:** персик обыкновенный, фитотехнологические параметры, экстрагирование, флавоноиды

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

**Вклад авторов.** Е. И. Молохова определила фитотехнологические показатели сырья и обосновала рациональный способ экстрагирования. Л. В. Иванцова подобрала факторы, обеспечивающие максимальный выход суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев. В. Д. Белоногова осуществляла заготовку растительного сырья и его фитохимический анализ. Все авторы в равной степени участвовали в обобщении научной литературы, обсуждении и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Для цитирования:** Молохова Е. И., Иванцова Л. В., Белоногова В. Д. Определение фитотехнологических параметров экстракта густого персика обыкновенного (*Persica vulgaris*) листьев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):57–63. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-57-63](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-57-63)

## Determination of Phytotechnological Parameters of the Dense Extract from Peach (*Persica vulgaris*) Leaves

Elena I. Molokhova✉, Lyubov V. Ivantsova, Valentina D. Belonogova

<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, Poleyaya str., Perm, 614990, Russia

✉ Corresponding author: Elena I. Molokhova. E-mail: profmol17@gmail.com

ORCID: Elena I. Molokhova – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>; Lyubov V. Ivantsova – <https://orcid.org/0000-0001-8095-3722>; Valentina D. Belonogova – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>.

Received: 14.10.2022

Revised: 21.11.2022

Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** Leaves of peach (*Persica vulgaris*), containing a large amount of biologically active substances, including flavonoids, are considered as promising plant source for producing extraction preparations.

© Молохова Е. И., Иванцова Л. В., Белоногова В. Д., 2022

© Molokhova E. I., Ivantsova L. V., Belonogova V. D., 2022

**Aim.** The purpose of the study: to establish the influence of phytotechnological parameters for efficiency of isolation of complex of biologically active substances from peach leaves.

**Materials and methods.** The object of the study was samples of dried leaves of the cultivated peach tree – *Persica vulgaris* Mill. (*Rosaceae* family) collected during the growing season (at the end of August). The main technological parameters of vegetable raw materials were studied: average particle size and fractional composition, volume characteristics of specific, volume and bulk mass, porosity, porosity and free volume of the raw material layer, as well as the absorption coefficient of the extractant.

**Results and discussion.** The obtained values of the fractional composition and volume characteristics indicate the expediency of using the maceration method in plant raw materials extraction. Experimental studies were carried out to select optimal modes of extraction of flavonoids from peach leaves (extractant, extraction temperature, extraction duration, degree of raw material grinding, hydromodule), which ensure high output of BAS complex into extract.

**Conclusion.** The study presents the analysis of phytotechnological parameters of peach leaves, a rational extraction method is justified – maceration at heating with periodic stirring, and extraction conditions are determined; providing maximum yield of active substances: temperature – 70 °C in 40 min, extractant – alcohol, ethyl solution 70 %, degree of raw material grinding – 2 mm, raw material:extractant ratio (1:10).

**Keywords:** common peach, phytotechnological parameters, extraction, 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.** Elena I. Molokhova determined the phytotechnological parameters of raw materials and justified the rational method of extraction. Lyubov V. Ivantsova selected factors that ensure the maximum yield of the amount of flavonoids from peach leaves. Valentina D. Belonogova carried out harvesting of plant raw materials and its phytochemical analysis. All authors equally participated in generalization of scientific literature, discussion and writing of the text of the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Molokhova E. I., Ivantsova L. V., Belonogova V. D. Determination of phytotechnological parameters of the dense extract from peach (*Persica vulgaris*) leaves. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):57–63. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-57-63](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-57-63)

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из векторов развития производства фитохимических препаратов является использование новых видов растительного сырья. При этом определяются потенциально значимые растительные культуры, подтверждается наличие в них биологически активных веществ с установлением количественного содержания, разрабатываются методики получения экстрактов в целях дальнейшего создания лекарственных растительных препаратов (ЛРП). В настоящее время в качестве источника биологически активных веществ (БАВ) активно изучается сырье плодовых культивируемых деревьев, в том числе и листья.

За последнее десятилетие проведено ряд фитохимических исследований листьев плодово-ягодных деревьев. Разработка технологии и анализ экстракта листьев кизила жидкого проведена в Пятигорском филиале Волгоградского государственного медицинского университета (ПМФИ). В качестве способа экстрагирования выбрана реперколяция [1]. Кроме того, в ПМФИ активно проводится изучение листьев грецкого ореха в качестве растительного сырья для получения экстракционных препаратов. Для разработки технологии экстракта из листьев ореха грецкого подобран экстрагент, позволяющий оптимально извлекать комплекс БАВ, определяющих фармакологические свойства – спирт этиловый 40 % [2]. На способ получения экстракта листьев ореха грецкого получен патент [3].

В ПМГМУ им. И. М. Сеченова определены основные параметры экстракции БАВ из каштана конского обыкновенного листьев и разработана рациональная схема, позволяющая получить экстракт сухой [4]. Для разработки технологии экстракта из листьев ореха грецкого подобран экстрагент, извлекающий как весь комплекс БАВ, так и нафтохиноны, обеспечивающие основные фармакологические свойства – спирт этиловый 40, в качестве методом экстракции – реперколяция.

Учитывая анализ литературных данных, изучение листьев плодовых деревьев вызывает несомненный интерес у исследователей. Плодовые деревья рассматривают не только как пищевой источник, но и как источник сырья, содержащего БАВ, с возможностью применения в медицине и фармации. Безусловным преимуществом является то, что плодовые деревья культивируются, а, следовательно, расширение сфер применения и повышение эффективности их использования представляются актуальными.

Среди культивируемых плодовых деревьев большой интерес вызывает персик обыкновенный, широко используемый в народной и традиционной медицине, а также в виде биологически активных добавок (БАД). Перспективность использования листьев персика обусловлена наличием в их составе веществ фенольной структуры, в частности флавоноидов [5]. Результаты экспериментальных исследований указывают на перспективность перевода листьев персика обыкновенного из сырья для БАД в разряд лекарственного растительного сырья и создания

высокоэффективных и безопасных лекарственных средств на его основе.

При разработке экстракционных препаратов из листьев персика обыкновенного необходимо проведение не только фармакогностических и биологических исследований, но и определение фитотехнологических параметров сырья. Актуальность этих исследований подтверждена в работах современных исследователей по изучению травы полыни Гмелина [6], травы кирказона ломоносовидного [7], травы тимьяна [8] при создании эффективной технологии экстрактов.

**Цель исследования:** установление влияния фитотехнологических параметров на эффективность выделения комплекса биологически активных веществ из персика обыкновенного листьев.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Объектом исследования являлись 2 образца высушенных листьев культивируемого дерева персика обыкновенного – *Persica vulgaris* Mill. (сем. розоцветных – *Rosaceae*), собранных в период вегетации (в конце августа). Объекты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Объекты исследования

Table 1. Objects of study

Образец Sample	Место сбора/место изготовления Place of collection/place of manufacture	Время сбора/дата изготовления Harvest time/ manufacture date
Персика обыкновенного листа, образец № 1 Common peach leaves, sample No. 1	Окрестности г. Геленджик, Краснодарский край Neighborhood of Gelendzhik, Krasnodar Territory	Август 2016 г. August 2016
Персика обыкновенного листа, образец № 2 Common peach leaves, sample No. 2	Окрестности г. Майкоп, Краснодарский край Neighborhood of Maikop, Krasnodar Territory	Август 2017 г. August 2017

Образцы сырья анализировались по ОФС.1.5.1.0003.15 «Листья»<sup>1</sup>.

### Методы

В работе исследованы следующие технологические параметры используемого растительного сырья: средний размер частиц и фракционный состав, объемные характеристики удельной, объемной и насыпной масс, показатели пористости, порозности и свобод-

ный объем слоя сырья. а также коэффициент поглощения экстрагента.

Средний размер частиц и коэффициенты поглощения оценивали по ОФС<sup>2,3</sup>. Определение влажности проводили по стандартной методике, предложенной в ГФ 14, ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»<sup>4</sup>. Объемные характеристики листьев персика обыкновенного оценивали по методикам, представленным в литературе [6, 7]. Определение каждого параметра выполняли с 5 пробами каждого образца сырья.

Проведен подбор оптимальных режимов экстрагирования суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев: экстрагент, температура экстракции, продолжительность экстракции, степень измельчения сырья, гидромодуль.

**Методика:** в колбу помещали 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 0,5–6 мм, добавляли экстрагент (вода очищенная, спирт этиловый 40, 70, 90 %), в соотношении сырье:экстрагент – 1:7, 1:10, 1:15, 1:20 и выдерживали в течение 20–90 мин при температуре 40–100 °С на водяной бане. Извлечения охлаждали при температуре 5–8 °С в течение 3 суток, отфильтровывали через друк-фильтр. В полученных извлечениях определяли количественное содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, по разработанной нами методике [5].

Количественное определение дубильных веществ в сырье и экстракте густом проводили перманганатометрическим методом по методике ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»<sup>5</sup>. Количественное определение каротиноидов – спектрофотометрическим ме-

<sup>2</sup> ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/47>. Ссылка активна на 23.10.2022.

<sup>3</sup> ОФС.1.5.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/47>. Ссылка активна на 23.10.2022.

<sup>4</sup> ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/47>. Ссылка активна на 23.10.2022.

<sup>5</sup> ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/47>. Ссылка активна на 23.10.2022.

<sup>1</sup> ОФС.1.5.1.0003.15 Листья. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/47>. Ссылка активна на 23.10.2022.

тодом, аскорбиновой кислоты – титриметрическим по ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды»<sup>1</sup>.

Статистическую обработку всех экспериментальных данных проводили согласно ГФ XIV издания, ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента», при помощи критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при вероятности 95 % ( $p \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения среднего размера частиц и преобладающей фракции в образцах сырья представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Анализ фракционного состава образцов сырья листьев персика обыкновенного

**Table 2.** Analysis of the fractional composition of samples of raw peach leaves

Образец сырья № 1 Raw material sample No. 1					
№ п/п No. p/p	Размер отверстий сит, мм Size of sieve openings, mm	Масса каждой фракции, г Mass of each fraction, g	Навеска фактическая, г Actual hitch, g	Массовая доля каждой фракции, % Mass fraction of each fraction, %	Средний размер частиц, мм Average particle size, mm
1	10	2,479	49,904	4,97	–
2	7	5,375		10,77	8,5
3	6	8,297		16,63	6,5
4	5	14,738		<b>29,53</b>	5,5
5	3	7,660		15,35	4
6	2	9,187		18,41	2,5
7	1	2,168		4,34	1,5
Образец сырья № 2 Raw material sample No. 2					
№ п/п No. p/p	Размер отверстий сит, мм Size of sieve openings, mm	Масса каждой фракции, г Mass of each fraction, g	Навеска фактическая, г Actual hitch, g	Массовая доля каждой фракции, % Mass fraction of each fraction, %	Средний размер частиц, мм Average particle size, mm
1	10	1,452	49,691	2,92	–
2	7	2,184		4,4	8,5
3	6	3,422		6,89	6,5
4	5	15,630		<b>31,45</b>	5,5
5	3	7,673		15,45	4
6	2	11,780		23,70	2,5
7	1	7,550		15,19	1,5

При анализе фракционного состава растительной массы выявлена преобладающая фракция со средним размером частиц 5,5 мм. Данный показатель для сырья является оптимальным для экстрагирования. При этом сырье имеет большую поверхность сопри-

<sup>1</sup> ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды». Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/47>. Ссылка активна на 23.10.2022.

косновения с экстрагентом, но малое количество разрушенных клеток, а значит в экстракт перейдет максимум БАВ при минимальном количестве балластных веществ.

Результаты определения объемных фитотехнологических параметров растительного сырья представлены в таблице 3. При анализе этих показателей особое внимание обращали на параметры, оказывающие существенное влияние на полноту и скорость экстрагирования растительного сырья. К таким параметрам относятся: насыпная масса, а также пористость и порозность слоя.

**Таблица 3.** Объемные технологические параметры образцов изучаемого растительного материала

**Table 3.** Volumetric technological parameters of samples of the studied plant material

№ п/п No. p/p	Технологический параметр Technological parameter	Значение Meaning		Среднее значение Mean
		Образец № 1 Sample No. 1	Образец № 2 Sample No. 2	
1	Удельная масса Specific gravity	1,47	1,38	1,42 ± 0,57
2	Объемная масса Volumetric mass	0,87	0,50	0,69 ± 2,35
3	Насыпная масса Bulk mass	0,18	0,19	0,18 ± 0,06
4	Пористость Porosity	0,41	0,64	0,53 ± 1,46
5	Порозность Porosity	0,79	0,63	0,71 ± 1,02
6	Свободный объем слоя сырья Free volume of raw material layer	0,88	0,87	0,88 ± 0,06

Насыпная масса листьев персика обыкновенного составляет 0,18 г/см<sup>3</sup>. Данный показатель примерно сопоставим с насыпной массой листьев красавки – 0,20 г/см<sup>3</sup>. Сырье является легкоподвижным. Для экстрагирования сырья подойдет экстрактор относительно небольших размеров.

Пористость сырья составляет 0,53 г/см<sup>3</sup>, что является более низким показателем по сравнению с травой тимьяна – 0,65 г/см<sup>3</sup> [8]. Следовательно, внутреннего сока при набухании сырья образуется немного. Высокие значения показателей объемной массы и порозности характеризует сырье как рыхлое и сыпучее. При таких показателях характерно образование большого количества внешнего сока при набухании сырья, обеспечивающего хорошую скорость смачивания и быстрое набухание. В связи с этим наиболее рациональным методом получения экстракта из персика обыкновенного листьев является мацерация. Рыхлое сыпучее сырье склонно быстро забивать перколятор при экстрагировании методом реперколяции, что значительно снижает эффективность производства экстракта. Кроме того, анализ методов экстракции, используемых для извлечения флавоноидов из ле-

карственного растительного сырья установил, что наибольший выход флавоноидов достигается методом мацерации при нагревании с периодическим перемешиванием [9].

Результаты определения коэффициентов поглощения для персика обыкновенного листьев представлены в таблице 4.

**Таблица 4.** Показатели коэффициентов водопоглощения и спиртопоглощения для листьев персика обыкновенного

**Table 4.** Indicators of water and alcohol absorption coefficients for common peach leaves

№ п/п No. p/p	Экстракт Extractant	Значение Meaning		Среднее значение Mean
		Образец № 1 Sample No. 1	Образец № 2 Sample No. 2	
1	Вода Water	2,87	2,88	2,88 ± 0,01
2	Этиловый спирт 70 % Ethyl alcohol 70 %	2,20	2,30	2,25 ± 0,05

Результаты определения коэффициентов поглощения показали, что количество воды, удерживаемое 1,0 г растительного сырья после его отжатия, на 30 % больше, чем количество спирта этилового 70 %, удерживаемое тем же количеством растительного сырья после отжатия. Следовательно, при приготовлении водного извлечения расход экстрагента будет больше, чем при приготовлении эквивалентного количества спиртового извлечения из листьев персика обыкновенного.

Полученные данные использовались при оценке качества исходного сырья и при установлении условий экстрагирования, обеспечивающего максимальный выход действующих веществ. Проведен подбор оптимальных режимов экстрагирования суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев: экстрагент, температура экстракции, продолжительность экстракции, степень измельчения сырья, гидромодуль.

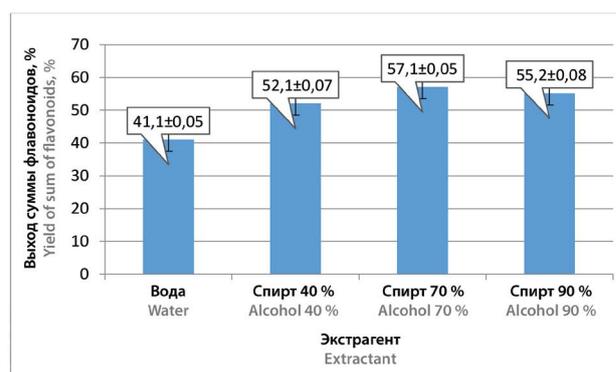
Результаты опытов с использованием различных экстрагентов приведены на рисунке 1.

На основании анализа данных, представленных на рисунке 1, установлено, что наилучшим экстрагентом является спирт этиловый раствор 70 %, так как обеспечивает максимальный выход флавоноидов.

Для определения температурного режима экстрагирования изучено влияние нагревания на выход суммы флавоноидов. Результаты анализа приведены на рисунке 2.

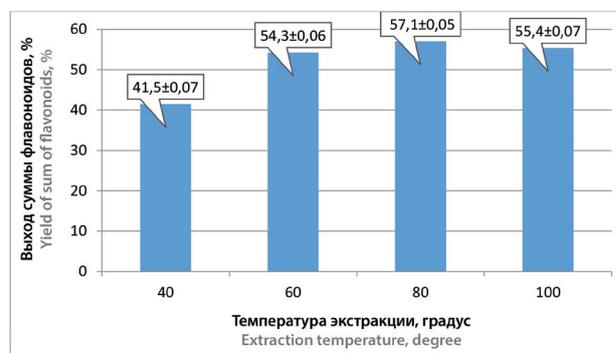
На основании анализа данных, представленных на рисунке 2, установлено, что наибольший выход флавоноидов достигается при проведении экстракции при температуре 80 °С, при которой так же наблюдается наибольший выход флавоноидов.

Для определения продолжительности экстракции изучено влияние времени на выход суммы фла-



**Рисунок 1.** Выход суммы флавоноидов в зависимости от состава экстрагента

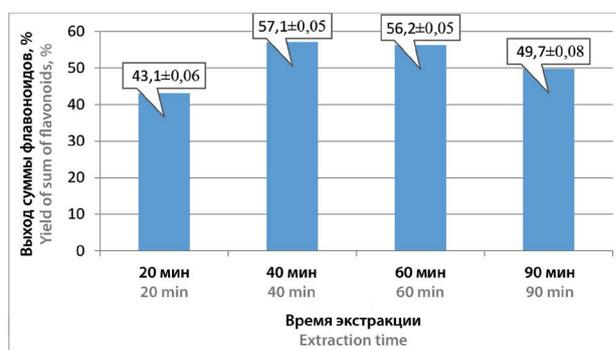
**Figure 1.** The yield of the total flavonoids depending on the composition of the extractant



**Рисунок 2.** Выход суммы флавоноидов в зависимости от температуры экстракции

**Figure 2.** Total yield of flavonoids depending on the extraction temperature

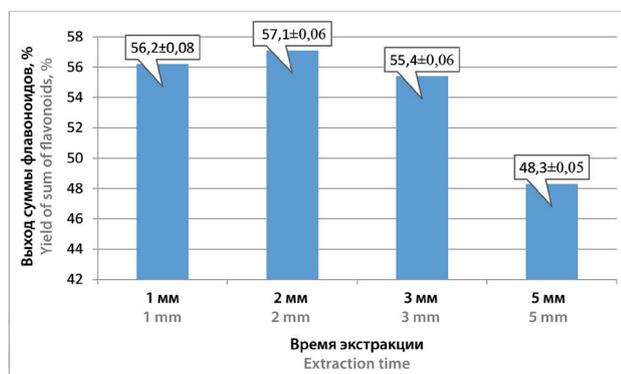
воноидов. Результаты анализа приведены на рисунке 3. На основании анализа данных, представленных на рисунке 3, установлено, что наибольший выход флавоноидов достигается при экстракции в течение 40 минут.



**Рисунок 3.** Выход суммы флавоноидов в зависимости от продолжительности экстракции

**Figure 3.** Total yield of flavonoids depending on the duration of extraction

При изучении степени измельчения на выход суммы флавоноидов. Сырье просеивали через сита с отверстиями диаметром 1–5 мм. Полученные результаты представлены на рисунке 4. Установлено, что наибольший выход суммы флавоноидов наблюдается при экстрагировании сырья со степенью измельчения 2 мм.



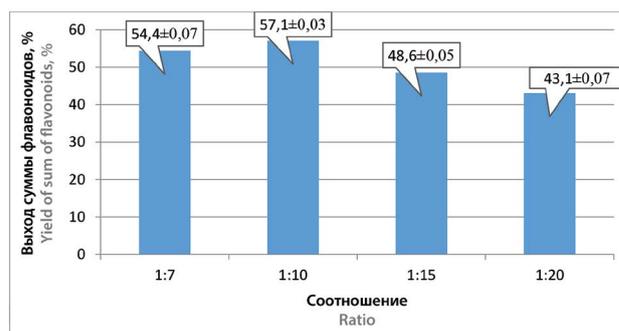
**Рисунок 4.** Выход суммы флавоноидов в зависимости от степени измельчения сырья

**Figure 4.** The yield of the total flavonoids depending on the degree of grinding of raw materials

При изучении влияния гидромодуля экстракции на выход флавоноидов из персика обыкновенного листьев, готовили извлечения из сырья с размером частиц 2 мм в соотношении 1:7, 1:10, 1:15, 1:20. Время экстракции составляло 40 мин, в качестве экстрагента использовали спирт этиловый раствор 70 %, обеспечивающий максимальный выход флавоноидов из персика обыкновенного листьев.

На основании анализа данных, представленных на рисунке 5, установлено, что наибольший выход суммы флавоноидов наблюдается при соотношении сырье:экстрагент (1:10).

Установленные параметры экстрагирования использовали для получения извлечений из персика обыкновенного листьев, которые в дальнейшем подвергали очистке методом отстаивания в плотно закрытой емкости при температуре 5–8 °С в течение 3 суток. После отстаивания извлечение фильтровали с помощью друк-фильтра и очищенную вытяжку выпаривали в вакуум-выпарной установке при температуре 65–70 °С и глубине вакуума –0,75–0,85 бар, до остаточной влажности не более 20 % для получения экстракта густого. Выбор технологии густого экстракта обоснован экономической целесообразностью и более расширенным спектром его применения в различных лекарственных формах, таких как сироп, эликсир, эмульсии, суспензии, гранулы, мягкие желатиновые капсулы, суппозитории ректальные, вагинальные и мягкие лекарственные формы для наружного применения.



**Рисунок 5.** Зависимость выхода суммы флавоноидов из листьев персика обыкновенного от соотношения сырье:экстрагент

**Figure 5.** Dependence of the yield of the total flavonoids from common peach leaves on the ratio of raw material:extractant

По предложенной технологии получено пять серий экстракта густого персика обыкновенного листьев. В ходе исследования состава БАВ в полученных экстрактах установлено наличие комплекса флавоноидов, каротиноидов, аскорбиновой кислоты. Содержание БАВ в сырье персика обыкновенного листьев и экстракте густом представлено в таблице 5.

**Таблица 5.** Сравнительный анализ содержания биологически активных веществ в листьях персика обыкновенного и экстракте густом на его основе

**Table 5.** Comparative analysis of the content of biologically active substances in peach leaves and thick extract based on it

Наименование БАВ BAS name	Содержание в лекарственном растительном сырье (среднее значение), % Content in medicinal plant materials (average value), %	Содержание в экстракте густом (среднее значение), % Content in thick extract (mean), %	% перехода БАВ из сырья в экстракт % transfer of biologically active substances from raw material to extract
Флавоноиды, в пересчете на рутин Flavonoids, in terms of rutin	1,78	5,1	89,5
Дубильные вещества в пересчете на танины Tannins in terms of tannins	1,82	6,07	95,0
Каротиноиды Carotenoids	0,087	0,73	97,0
Аскорбиновая кислота Vitamin C	0,018	1,10	98,0

Как видно из таблицы 5, полученный экстракт густой содержит большое количество БАД. Из персика обыкновенного листьев в экстракт густой перешло 89,5 % рутина, 95 % – дубильных веществ, 97 % – каротиноидов, 98 % – аскорбиновой кислоты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспериментально определены технологические параметры листьев персика обыкновенного: средний размер частиц, удельная масса, объемная масса, насыпная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья, коэффициент поглощения экстрагента (для воды и 70 % этилового спирта). Средний размер частиц – 5,5 мм. Коэффициент водопоглощения – 2,87. Коэффициент спиртопоглощения (для спирта этилового 70 %) – 2,25. Изучаемое сырье обладает высокими показателями объемных характеристик (объемная масса, порозность).
2. В результате исследования установлены фитотехнологические параметры для персика обыкновенного листьев и подобраны факторы, обеспечивающие максимальный выход суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев: мацерация при температуре 70 °С в течение 40 мин, экстрагент – спирт этиловый раствор 70 %, степень измельчения сырья – 2 мм, соотношение сырье:экстрагент (1:10).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шаталова Т. А., Айрапетова А. Ю., Мичник Л. А., Погорелов В. И., Хромцова Е. Н., Луговой И. С., Саджая Л. А. Разработка технологии и анализ экстракта листьев кизила жидкого. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2012;14(5–3):768–770.
2. Постоюк Н. А., Маркарян А. А., Даргаева Т. Д., Сокольская Т. А. Изучение стадии экстрагирования при получении сухого экстракта каштана конского. *Фармация*. 2012;4:32–33.
3. Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н., Верниковский В. В. Разработка и стандартизация лекарственных растительных препаратов из листьев ореха грецкого. *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада*. 2018;146:153–158.
4. Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н., Верниковский В. В. Способ получения экстракта листьев грецкого ореха. Патент РФ на изобретение № RU2632488.C2. 10.05.2017. Доступно по: <https://patenton.ru/patent/RU2632488C2>. Ссылка активна на 21.10.2022.
5. Иванцова Л. В., Белоногова В. Д., Гилева А. А. Определение флавоноидов в листьях персика обыкновенного: валидация методики. *Фармация*. 2018;67(7):27–31. DOI: 10.29296/25419218-2018-07.
6. Сакипова З. Б., Маматова А. С., Кисличенко В. С., Новосел Е. Н. Определение технологических параметров травы полыни Гмелина. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2016;2(2):58–62. DOI: 10.15587/2519-4852.2016.76676.
7. Суина И. О., Тернинко И. И. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья *Aristolochia Clematitis L.* Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017;4:202–205.
8. Жумаханова Б. С., Оразалиева М., Кесикова А. А., Ибадуллаева Ф. С., Сакипова З. Б. Изучение технологических параметров сырья тимьяна (*Thymus L.*). *Вестник КазНМУ*. 2018;4:163–166.
9. Kwon D.-J., Bae Y.-S. Chemical constituents from the stem bark of *Acer barbinerve*. *Chemistry of Natural Compounds* 2011;47(4):636–638.

## REFERENCES

1. Shatalova T. A., Ayrapetova A. Y., Michnik L. A., Miconik O. V., Pogorelov V. I., Khromtsova E. N., Lugova I. S., Sajaya L. A. Development of technology and analysis of the leaves of Kizil Kizil. *News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2012;14(5–3):768–770. (In Russ.)

2. Stuyuk H. A., Markaryan A. A., Dargaeva T. D., Sokolskaya T. A. Study of the extraction stage when obtaining dry horse chestnut extract. *Pharmacy*, 2012;4:32–33. (In Russ.)
3. Dyronas Zh. V., Zilfratov I. N., Vernikovskiy V. V. Development and standardization of medicinal plant drugs from walnut leaves. *Collection of scientific works of the State Nikitsky Botanical Garden*. – 2018;146:153–158. (In Russ.)
4. Daironas Zh. V., Zilfikarov I. N., Vernikovskiy V. V. Method for obtaining an extract of walnut leaves. Patent RUS No. RU2632488.C2. 10.05.2017. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2632488C2> Accessed: 21.10.2022. (In Russ.)
5. Ivantsova L. V., Belonogova V. D., Gileva A. A. Determination of flavonoids in the leaves of the Persian ordinary: Validation of the methodology. *Pharmacy*. 2018;67(7):27–31. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2018-07.
6. Sakipova Z. B., Mamatova A. S., Kislichenko V. S., Novosel E. N. Determining the technological parameters of wormwood Gmelin. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2016;2(2):58–62. (In Russ.) DOI: 10.15587/2519-4852.2016.76676.
7. Suina I. O., Terninko I. I. Study of technological parameters and numerical indicators of the quality of raw materials *Aristolochia Clematitis L.* *Development and registration of drugs*. 2017;4:202–205. (In Russ.)
8. Zhmaakanova B. S., Orazalieva M., Kesikova A. A., Ibadullaeva G. S., Sakipova Z. B. The study of the technological parameters of herbal substance *Thymus L.* *Bulletin of KazNMU*; 2018;4:163–165. (In Russ.)
9. Kwon D.-J., Bae Y.-S. Chemical constituents from the stem bark of *Acer barbinerve*. *Chemistry of Natural Compounds* 2011;47(4):636–638.



Оригинальная статья / Research article

## Изучение влияния технологического режима изготовления водного извлечения из шиповника плодов (*Rosae fructus*) на содержание аскорбиновой кислоты

Ф. В. Собин<sup>1</sup>✉, Л. К. Коростелева<sup>2</sup>, Т. А. Луткова<sup>3</sup>, Н. В. Дозморова<sup>1</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 «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Омский ГМУ» Минздрава России), 644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), 614990, Россия, Пермь, ул. Букирева, д. 15

✉ Контактное лицо: Собин Федор В. E-mail: fff-2005@mail.ru

ORCID: Ф. В. Собин – <https://orcid.org/0000-0002-8416-6934>; Л. К. Коростелева – <https://orcid.org/0000-0003-0129-5245>; Т. А. Луткова – <https://orcid.org/0000-0002-5664-8725>; Н. В. Дозморова – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 25.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** COVID-19 признан самой значимой пандемией современной эпохи. Исследования показали потенциальную пользу приема аскорбиновой кислоты в комплексном лечении данного заболевания, особенно у лиц с дефицитом витамина С. Одним из самых популярных и доступных источников введения аскорбиновой кислоты в рацион являются шиповника плоды. Качество водных извлечений из растительного сырья зависит от ряда технологических факторов. Изучение влияния технологического режима изготовления водного извлечения из шиповника плодов на высвобождении аскорбиновой кислоты в полученных лекарственных формах является актуальным.

**Цель.** Получить различными режимами изготовления водные извлечения из шиповника плодов и изучить влияние технологических параметров на содержание аскорбиновой кислоты.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явились шиповника плоды в пачках и водные извлечения на их основе, полученные 6 различными способами. Использованы фармакопейные методики, рекомендации производителей, а также термосное настаивание без и с предварительным нагреванием колбы термоса. Для количественного определения аскорбиновой кислоты в полученных водных извлечениях нами использован фармакопейный метод (титрование с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия).

**Результаты и обсуждение.** Наименьшее содержание аскорбиновой кислоты отмечено в отваре по фармакопейной методике. Высокие показатели содержания аскорбиновой кислоты отмечены при различных вариантах термосного настаивания шиповника плодов.

**Заключение.** Нами получены экстемпоральные водные извлечения шиповника плодов 6 различными режимами экстрагирования. По содержанию аскорбиновой кислоты наиболее эффективным методом получения экстемпорального водного извлечения шиповника плодов является шестичасовое термосное настаивание с предварительным прогревом колбы термоса. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты высвобождается при шестичасовом термосном настаивании. В двенадцатичасовых термосных настоях обнаружено уменьшение количества аскорбиновой кислоты. Установлено, что предварительный прогрев колбы термоса приводит к увеличению выхода аскорбиновой кислоты в водное извлечение на 25 %.

**Ключевые слова:** шиповника плоды, водные извлечения, аскорбиновая кислота

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

**Вклад авторов.** Ф. В. Собин подобрал варианты экстрагирования и изготовил водные извлечения шиповника плодов, принимал непосредственное участие в написании и корректировке статьи. Л. К. Коростелева осуществляла научное руководство проведенных исследований и рецензированием статьи. Т. А. Луткова и Н. В. Дозморова провели количественное определение аскорбиновой кислоты фармакопейным методом (титрование с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия), участвовали в непосредственном написании и редактировании статьи. Данная работа была написана и согласована при участии всех авторов.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Собин Ф. В., Коростелева Л. К., Луткова Т. А., Дозморова Н. В. Изучение влияния технологического режима изготовления водного извлечения из шиповника плодов (*Rosae fructus*) на содержание аскорбиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4-1):64–67. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-64-67](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-64-67)

## Study of the Influence of the Technological Regime of the Production of Water Extraction from Rosehip Fruits (*Rosae fructus*) on the Content of Ascorbic Acid

Fedor V. Sobin<sup>1</sup>✉, Ludmila K. Korosteleva<sup>2</sup>, Tatyana A. Lutkova<sup>3</sup>, Natalya V. Dozmorova<sup>1</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, Poleyaya str., Perm, 614990, Russia

<sup>2</sup> Omsk State Medical University, 12, Lenina str., Omsk, 644099, Russia

<sup>3</sup> Perm State University (PSU), 15, Bukireva str., Perm, 614990, Russia

✉ Corresponding author: Fedor V. Sobin. E-mail: fff-2005@mail.ru

© Собин Ф. В., Коростелева Л. К., Луткова Т. А., Дозморова Н. В., 2022

© Sobin F. V., Korosteleva L. K., Lutkova T. A., Dozmorova N. V., 2022

ORCID: Fedor V. Sobin – <https://orcid.org/0000-0002-8416-6934>; Ludmila K. Korosteleva – <https://orcid.org/0000-0003-0129-5245>; Tatyana A. Lutkova – <https://orcid.org/0000-0002-5664-8725>; Natalya V. Dozmorova – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>.

Received: 14.10.2022 Revised: 25.11.2022 Published: 27.12.2022

## Abstract

**Introduction.** COVID-19 is recognized as the most significant pandemic of the modern era. Studies have shown the potential benefits of taking ascorbic acid in the complex treatment of this disease, especially in people with vitamin C deficiency. One of the most popular and affordable sources of ascorbic acid in the diet are rosehip fruits. The quality of water extracts from plant raw materials depends on a number of technological factors. The study of the influence of the technological regime of the production of water extraction from rosehip fruits on the release of ascorbic acid in the obtained dosage forms is relevant.

**Aim.** To obtain water extracts from rosehip fruits by various production modes and to study the effect of technological parameters on the content of ascorbic acid.

**Materials and methods.** The object of the study was rosehip fruits in bundles and water extracts based on them, obtained in the 6 different ways. Pharmacopoeial techniques, manufacturers' recommendations, as well as thermos infusion with and without preheating of the thermos flask were used. For quantitative determination of the ascorbic acid in the obtained aqueous extracts, we used the pharmacopoeia method (titration with 2,6-dichlorophenolindophenolate sodium).

**Results and discussion.** The lowest content of ascorbic acid was noted in the decoction according to the pharmacopoeia method. High levels of ascorbic acid content were noted in the variants of thermos infusion of rosehip fruits.

**Conclusion.** We have obtained extemporal water extracts of rosehip fruits by the 6 different extraction modes. According to the content of ascorbic acid, the most effective method of obtaining extemporal water extraction of rosehip fruits is a six-hour thermos infusion with preheating of the thermos flask. The largest amount of ascorbic acid is released during a six-hour thermos infusion. In the twelve-hour thermos infusions, a decrease in the amount of ascorbic acid was found. It was found that preheating the thermos flask leads to an increase in the yield of ascorbic acid in aqueous extraction by 25 %.

**Keywords:** rosehip fruits, aqueous extracts, ascorbic acid

**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.** Fedor V. Sobin selected extraction options and produced water extracts of rosehip fruits, took a direct part in writing and correcting the article. Ludmila K. Korosteleva provided scientific guidance for the research and review of the article. Tatyana A. Lutkova and Natalya V. Dozmorova carried out quantitative determination of ascorbic acid by the pharmacopoeial method (titration with 2,6-dichlorophenolindophenolate sodium), participated in the direct writing and editing of the article. This work was written and coordinated with the participation of all the authors.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Sobin F. V., Korosteleva L. K., Lutkova T. A., Dozmorova N. V. Study of the influence of the technological regime of the production of water extraction from rosehip fruits (*Rosae fructus*) on the content of ascorbic acid. *Drug development & registration*. 2022;11(4-1):64-67. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-64-67](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-64-67)

## ВВЕДЕНИЕ

COVID-19 признан глобальной проблемой здравоохранения и является самой значимой пандемией современной эпохи. Недавние исследования показали ингибирующую активность витамина С в репликации вирусов, включая репликацию вируса SARS CoV-2. Показана потенциальная польза приема аскорбиновой кислоты в комплексном лечении данного заболевания, особенно у лиц с дефицитом витамина С. Авторы сообщают о снижении смертности, снижении риска прогрессирования органной недостаточности и улучшении результатов рентгенографии у пролеченных пациентов по сравнению с контролем [1–4].

Адекватная и сбалансированная диета может быть эффективна в профилактике и лечении инфекционных заболеваний, таких как COVID-19. Одним из самых популярных и доступных источников введения аскорбиновой кислоты в рацион являются шиповника

плоды. За последние годы экстрактивные препараты на основе показали различные виды фармакологического действия: противогриппозный эффект [5], применение для лечения остеоартрита [6] и сахарного диабета [7], цитотоксическое действие при раке прямой кишки [8, 9], а также антибактериальный эффект [10].

С незапамятных времен водные извлечения из лекарственного растительного сырья используются при различных патологиях, в том числе и инфекционных заболеваниях. Качество таких извлечений во многом зависит от ряда технологических факторов: соотношения сырья и экстрагента, температурного режима, времени настаивания и т. д. Таким образом, изучение влияния технологического режима изготовления водного извлечения из шиповника плодов на высвобождении аскорбиновой кислоты в полученных лекарственных формах является актуальным.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились шиповника плоды в пачках (АО «Красногорсклексредства», Россия, серия Z41ALLBECO809, срок годности до 12.2023). С целью подбора оптимального режима экстемпорального изготовления водного извлечения нами получены водные извлечения из данного лекарственного растительного сырья с использованием 5 технологических режимов, представленных в таблице 1. Нами использованы в работе фармакопейные методики, рекомендации производителей, а также наиболее доступное в домашних условиях термосное настаивание.

С целью интенсификации процесса экстрагирования нами использовано предварительное прогревание колбы термоса. В термос заливали кипящую воду до верха, термос плотно закрывали крышкой,

производили выдержку в течение 10 минут, далее воду сливали. Навеску сырья, помещенную в прогретый термос, заливали кипящей водой, плотно закрывали крышкой и настаивали с частым перемешиванием в течение 6 часов.

Для определения аскорбиновой кислоты в полученных водных извлечениях нами использована методика XIV издания Государственной фармакопеи Российской Федерации (ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды») (таблица 2).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные водные извлечения представляют собой жидкости различной интенсивности окраски от светло-бежевой до красно-коричневой, различной

**Таблица 1. Технологические режимы изготовления водных извлечений из шиповника плодов**

**Table 1. Technological modes of production of water extracts from rosehip fruits**

Вид водного извлечения Type of water extraction	Технологический режим Technological mode
Настой по методике XIV издания Государственной фармакопеи Российской Федерации Infusion according to the methodology of the XIV edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation	20 г плодов помещают в инфундирный стакан, заливают 200 мл воды очищенной комнатной температуры, взятой с учетом коэффициента водопоглощения, настаивают в инфундирном аппарате АИ-3 в течение 15 минут, затем охлаждают при комнатной температуре не менее 45 минут. Отфильтровывают. Объем полученного настоя доводят водой очищенной до 200 мл 20 g of fruits are placed in an infunder glass, pour 200 ml of purified room temperature water, taken into account the water absorption coefficient, insist in the AI-3 infunder apparatus for 15 minutes, then cool at room temperature for at least 45 minutes. Filter out. The volume of the resulting infusion is adjusted with purified water to 200 ml
Отвар по методике XIV издания Государственной фармакопеи Российской Федерации Decoction according to the method of the XIV edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation	20 г плодов помещают в инфундирный стакан, заливают 200 мл воды очищенной комнатной температуры, взятой с учетом коэффициента водопоглощения, настаивают в инфундирном аппарате АИ-3 в течение 30 минут, затем охлаждают при комнатной температуре не менее 10 минут. Отфильтровывают. Объем полученного отвара доводят водой очищенной до 200 мл 20 g of fruits are placed in an infunder glass, pour 200 ml of purified room temperature water, taken into account the water absorption coefficient, insist in the AI-3 infunder apparatus for 30 minutes, then cool at room temperature for at least 10 minutes. Filter out. The volume of the resulting broth is adjusted with purified water to 200 ml
Термосное настаивание в течение 6 часов (Термос Vitesse VS-1402, 0,5 л, стальной) Thermos infusion for 6 hours (Thermos Vitesse VS-1402, 0,5 l, steel)	10 г плодов помещают в прогретый термос, заливают 200 мл кипящей воды, плотно закрывают крышкой и настаивают с частым перемешиванием в течение 6 часов. Отфильтровывают. Объем полученного настоя доводят водой очищенной до 200 мл 10 g of fruits are placed in a heated thermos, poured with 200 ml of boiling water, tightly closed with a lid and infused with frequent stirring for 6 hours. Filter out. The volume of the resulting infusion is adjusted with purified water to 200 ml
Термосное настаивание в течение 12 часов (Термос Vitesse VS-1402, 0,5 л, стальной) Thermos infusion for 12 hours (Vitesse VS-1402 thermos, 0,5 l, steel)	10 г плодов помещают в прогретый термос, заливают 200 мл кипящей воды, плотно закрывают крышкой и настаивают с частым перемешиванием в течение 12 часов. Отфильтровывают. Объем полученного настоя доводят водой очищенной до 200 мл 10 g of fruits are placed in a heated thermos, poured with 200 ml of boiling water, tightly closed with a lid and infused with frequent stirring for 12 hours. Filter out. The volume of the resulting infusion is adjusted with purified water to 200 ml
Настой по методике производителя Infusion according to the manufacturer's method	10 г плодов помещают в эмалированную посуду, заливают 200 мл горячей воды очищенной, закрывают крышкой и нагревают на кипящей водяной бане 15 минут, охлаждают при комнатной температуре 45 минут, процеживают, оставшееся сырье отжимают. Объем полученного настоя доводят водой очищенной до 200 мл 10 g of fruits are placed in an enamel bowl, pour 200 ml of purified hot water, cover with a lid and heat in a boiling water bath for 15 minutes, cool at room temperature for 45 minutes, filter, squeeze the remaining raw materials. The volume of the resulting infusion is adjusted with purified water to 200 ml

степени мутности, с приятным плодово-ягодным запахом и характерным вкусом.

Установлено, что при изготовлении отвара по методике XIV издания Государственной фармакопеи Российской Федерации наблюдается наименьшее содержание аскорбиновой кислоты. В сравнении с фармакопейным настоем наблюдается уменьшение выхода витамина С более чем в четыре раза. Возможно, происходит окисление целевого продукта из-за длительного температурной обработки в 97 °С.

**Таблица 2. Содержание аскорбиновой кислоты в водных извлечениях из шиповника плодов**

**Table 2. The content of ascorbic acid in aqueous extracts from rosehip fruits**

Вид водного извлечения Type of water extraction	Содержание аскорбиновой кислоты, % Ascorbic acid content, %
Настой по методике XIV издания Государственной фармакопеи Российской Федерации Infusion according to the methodology of the XIV edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation	0,29 ± 0,026
Отвар по методике XIV издания Государственной фармакопеи Российской Федерации Decoction according to the method of the XIV edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation	0,066 ± 0,0015
Термосное настаивание в течение 6 часов (Термос Vitesse VS-1402, 0.5 л, стальной) Thermos infusion for 6 hours (Thermos Vitesse VS-1402, 0.5 l, steel)	0,56 ± 0,013
Термосное настаивание в течение 6 часов с предварительным нагревом колбы термоса (Термос Vitesse VS-1402, 0.5 л, стальной) Thermos infusion for 6 hours with preheating of the thermos flask (Vitesse VS-1402 thermos, 0.5 l, steel)	0,72 ± 0,003
Термосное настаивание в течение 12 часов (Термос Vitesse VS-1402, 0.5 л, стальной) Thermos infusion for 12 hours (Thermos Vitesse VS-1402, 0.5 l, steel)	0,47 ± 0,013
Настой по методике производителя Infusion according to the manufacturer's method	0,41 ± 0,012

Наибольшее количество аскорбиновой кислоты высвобождается при шестичасовом термосном настаивании. За счет многочасового контакта лекарственного растительного сырья с водой при повышенной температуре термосное настаивание может обеспечить максимальный выход в экстрагент биологически активных веществ. В двенадцатичасовых термосных настоях обнаружено уменьшение количества аскорбиновой кислоты по сравнению с шестичасовыми термосными настоями, что, скорее всего, связано с ее окислением. Установлено, что предвари-

тельный прогрев колбы термоса приводит к увеличению выхода аскорбиновой кислоты в водное извлечение на 25 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами получены экстемпоральные водные извлечения шиповника плодов 6 различными режимами экстрагирования. Оценено количественное содержание аскорбиновой кислоты фармакопейным методом (титрование с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия). По содержанию аскорбиновой кислоты наиболее эффективным методом получения экстемпорального водного извлечения шиповника является шестичасовое термосное настаивание с предварительным прогревом колбы термоса.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Reddy R. S. N., Batra M. V. N. J., Srivastava S., Syal S. K. Vitamin C and its therapeutic potential in the management of COVID-19. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2022;50:8–14. DOI: 10.1016/j.clnesp.2022.05.026.
- Firouzi S., Pahlavani N., Navashenaq J. G., Clayton Z. S., Beigomhammadi M. T., Malekhamdi M. The effect of Vitamin C and Zn supplementation on the immune system and clinical outcomes in COVID-19 patients. *Clinical Nutrition Open Science*. 2022;44:144–154. DOI: 10.1016/j.nutos.2022.06.006.
- Sinnberg T., Lichtensteiger C., Hill-Mündel K., Leischner C., Niesner H., Busch C., Renner O., Wyss N., Flatz L., Lauer U. M., Hoelzle L. E., Nohr D., Burkard M., Marongiu L., Venturelli S. Vitamin C deficiency in blood samples of COVID-19 patients. *Antioxidants*. 2022;11(8):1580. DOI: 10.3390/antiox11081580.
- Kumar P., Verma M. K., Sharma R., Agrawal R., Singh S. P., Jaiswal A., Prakash O., Soni N., Verma P., Siddiqui A. H., Gupta S., Sharma P. Immunomodulator vitamin C: an adjuvant therapy in second wave of coronavirus disease 2019. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2022;16(3):1465–1478. DOI: 10.22207/JJPM.16.3.46.
- Sargin S. A. Potential anti-influenza effective plants used in Turkish folk medicine: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;265:113319. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113319.
- Gruenwald J., Uebelhack R., Moré M. I. Rosa canina – Rose hip pharmacological ingredients and molecular mechanisms counteracting osteoarthritis – A systematic review. *Phytomedicine*. 2019;60:152958. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152958.
- Rahimi M., Sajadimajd S., Mahdian Z., Hemmati M., Malekhtabati P., Bahrami G., Mohammadi B., Miraghaee S., Hatami R., Mansouri K., Motlagh H. R. M., Keshavarzi S., Derakhshankhah H. Characterization and anti-diabetic effects of the oligosaccharide fraction isolated from *Rosa canina* in STZ-Induced diabetic rats. *Carbohydrate Research*. 2020;489:107927. DOI: 10.1016/j.carres.2020.107927.
- Turan I., Demir S., Kilinc K., Yaman S. O., Misir S., Kara H., Genc B., Mentese A., Aliyazicioglu Y., Deger O. Cytotoxic effect of *Rosa canina* extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018;8(6):394–399. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.12.005.
- Kilinc K., Demir S., Turan I., Mentese A., Orem A., Sonmez M., Aliyazicioglu Y. *Rosa canina* Extract has Antiproliferative and Proapoptotic Effects on Human Lung and Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*. 2020;72(2):273–282. DOI: 10.1080/01635581.2019.1625936.
- Milala J., Piekarska-Radzik L., Sójka M., Klewicki R., Matysiak B., Klewicki E. *Rosa* spp. Extracts as a factor that limits the growth of *Staphylococcus* spp. bacteria, a food contaminant. *Molecules*. 2021;26(15):4590. DOI: 10.3390/molecules26154590.



Оригинальная статья / Research article

## Химический анализ основных групп биологически активных веществ в сборе седативного действия

Е. А. Замахаева ✉, О. А. Олешко, О. В. Яборова, М. М. Смирнова

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

✉ Контактное лицо: Замахаева Екатерина Андреевна. E-mail: eka0\_0@rambler.ru

ORCID: Е. А. Замахаева – <https://orcid.org/0000-0003-2298-7283>; О. А. Олешко – <https://orcid.org/0000-0001-9211-0116>; О. В. Яборова – <https://orcid.org/0000-0002-9995-2989>; М. М. Смирнова – <https://orcid.org/0000-0002-0992-5152>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 28.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** По данным ВОЗ количество пациентов с заболеваниями нервной системы в мире увеличивается с каждым годом. Применение фитопрепаратов является перспективным направлением фармакотерапии, препараты из лекарственного растительного сырья имеют ряд преимуществ при лечении хронических заболеваний.

**Цель.** Качественный анализ и количественное определение основных групп биологически активных веществ сбора из лекарственного растительного сырья.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали сбор из лекарственного растительного сырья, разработанный на кафедре фармацевтической технологии ПГФА совместно с кафедрой фармакогнозии. Количественное определение биологически активных веществ сбора проводилось спектрофотометрическим методом [спектрофотометр Jenway PortLab 511 UV (PortLab Int., Великобритания)] и методом визуального титрования.

**Результаты и обсуждение.** В настоящей работе проведен качественный анализ и количественное определение содержания флавоноидов, фенольных соединений, сесквитерпеновых кислот и аскорбиновой кислоты, определен коэффициент водопоглощения сбора.

**Заключение.** В результате работы подтверждено содержание в разработанном сборе флавоноидов, фенольных соединений, сесквитерпеновых кислот и аскорбиновой кислоты, определено их количество, оказывающее непосредственное влияние на фармакологический эффект сбора.

**Ключевые слова:** лекарственное растительное сырье, сбор седативный, биологически активные вещества, спектрофотометрия, химический анализ

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

**Вклад авторов.** О. А. Олешко и Е. А. Замахаева разработали эксперимент. Е. А. Замахаева и О. В. Яборова провели исследование и теоретические расчеты. М. М. Смирнова участвовала в обработке данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Замахаева Е. А., Олешко О. А., Яборова О. В., Смирнова М. М. Химический анализ основных групп биологически активных веществ в сборе седативного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):68–72. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-68-72](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-68-72)

## Chemical Analysis of the Main Groups of Biologically Active Substances in Sedative Collection

Ekaterina A. Zamakhaeva ✉, Olga A. Oleshko, Olga V. Yaborova, Marina M. Smirnova

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

✉ Corresponding author: Ekaterina A. Zamakhaeva. E-mail: eka0\_0@rambler.ru

ORCID: Ekaterina A. Zamakhaeva – <https://orcid.org/0000-0003-2298-7283>; Olga A. Oleshko – <https://orcid.org/0000-0001-9211-0116>; Olga V. Yaborova – <https://orcid.org/0000-0002-9995-2989>; Marina M. Smirnova – <https://orcid.org/0000-0002-0992-5152>.

Received: 14.10.2022

Revised: 28.11.2022

Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** According to the World Health Organization, the number of patients with diseases of the nervous system in the world is increasing every year. The use of phytopreparations is a promising direction of pharmacotherapy; preparations from medicinal plant materials have a number of advantages in the treatment of chronic diseases.

**Aim.** Qualitative analysis and quantitative determination of the main groups of biologically active substances collected from medicinal plant materials.

© Замахаева Е. А., Олешко О. А., Яборова О. В., Смирнова М. М., 2022

© Zamakhaeva E. A., Oleshko O. A., Yaborova O. V., Smirnova M. M., 2022

**Materials and methods.** As an object of study, we used a collection of medicinal plant materials developed at the Department of Pharmaceutical Technology of the PSFA together with the Department of Pharmacognosy. Quantitative determination of biologically active substances of the collection was carried out by spectrophotometric method [Jenway PortLab 511 UV spectrophotometer PortLab Int., UK] and by visual titration.

**Results and discussion.** In this work, a qualitative analysis and quantitative determination of the content of flavonoids, phenolic compounds, sesquiterpenic acids and ascorbic acid was carried out, and the water absorption coefficient of the collection was determined.

**Conclusion.** As a result of the work, the content of flavonoids, phenolic compounds, sesquiterpenic acids and ascorbic acid in the developed collection was confirmed, their amount was determined, which directly affects the pharmacological effect of the collection.

**Keywords:** medicinal plant materials, sedative collection, biologically active substances, spectrophotometry, chemical analysis

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

**Contribution of the authors.** Olga A. Oleshko and Ekaterina A. Zamakhaeva developed an experiment. Ekaterina A. Zamakhaeva and Olga V. Yaborova conducted a study and theoretical calculations. Marina M. Smirnova participated in data processing. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Zamakhaeva E. A., Oleshko O. A., Yaborova O. V., Smirnova M. M. Chemical analysis of the main groups of biologically active substances in sedative collection. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):68–72. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-68-72](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-68-72)

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистическим данным о заболеваемости населения по основным классам, группам и отдельным болезням количество пациентов с заболеваниями нервной системы ежегодно растет. При этом наряду с серьезными поражениями нервной системы, все чаще проявляются так называемые «болезни цивилизации», рост которых обусловлен воздействием на организм неблагоприятных социально-бытовых факторов, уменьшением доли физического труда в жизни современного человека, информационными перегрузками и психотравмирующими ситуациями. К таким патологиям относят вегетоневрозы, легкие невроты с фобическими расстройствами, проблемы с засыпанием, повышенная возбудимость, неврастения. По данным ВОЗ за последние 65 лет заболеваемость невротами в мире возросла более чем в 20 раз<sup>1</sup>.

Перспективным направлением терапии заболеваний нервной системы хронического характера и заболеваний, находящихся на начальном этапе развития является использование фитопрепаратов. Они обладают более широким спектром действия и способны охватить патогенез и симптоматику заболевания в целом, обладают накопительным действием, что позволяет их использовать в течение длительного времени, легко включаются в обменные процессы, практически не вызывают побочных эффектов и за-

частую снижают отрицательные последствия других препаратов<sup>2</sup>.

На кафедре фармацевтической технологии ПГФА совместно с кафедрой фармакогнозии разработан сбор из лекарственного растительного сырья седативного действия. Согласно работам по исследованию активности отдельных видов лекарственного растительного сырья компоненты сбора проявляют седативное [1–3], анксиолитическое [4], нейротропное [5, 6], антидепрессантное действие [7–10].

Для количественного определения основных групп биологически активных веществ были использованы широко применяемые для анализа лекарственного растительного сырья методы спектрофотометрии и визуального титрования [11,12].

**Цель работы** заключается в количественном определении основных групп биологически активных веществ (БАВ) сбора седативного действия.

В ходе работы подтверждено наличие в сборе флавоноидов, сесквитерпеновых кислот, фенольных соединений, аскорбиновой кислоты и определено их количественное содержание.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объект исследования

Сбор из лекарственного растительного сырья – валерианы лекарственной корневища с корнями (*Valeriana officinalis rhizomata cum radicibus*), зверобоя

<sup>1</sup> Здравоохранение в России. 2019. Доступно по: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravoohran-2019.pdf> Ссылка активна на 19.07.2022.

<sup>2</sup> Стратегия ВОЗ в области народной медицины. Доступно по: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789244506097\\_rus.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/92455/9789244506097_rus.pdf). Ссылка активна на 10.08.2022.

трава (*Hyperici herba*), Melissa лекарственной трава (*Melissae officinalis herba*), шиповника плоды (*Rosae fructus*).

### Оборудование

Спектрофотометр Jenway PortLab 511 UV (PortLab Int., Великобритания).

### Используемые реактивы

Гидроксиламин (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия), кислота хлористоводородная (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия), железа хлорид (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия), СО рутина (АО «ФПК ФармВИЛАР», Россия), алюминия хлорид (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия), спирт этиловый 50, 96 % (АО «Пермфармация», Россия), уксусная кислота разведенная (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия), 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (х.ч., АО «ЛенРеактив», Россия), раствор аммиака (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия). Натрия фосфорномолибденовокислый, свинца ацетат, квасцы железомолибденовые, алюминия хлорид (х.ч., АО «Химреактивснаб», Россия).

### Коэффициент водопоглощения

Определение коэффициента водопоглощения проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья» ГФ XIV<sup>1</sup>.

### Качественный анализ

Присутствие аскорбиновой кислоты определяли по реакции с раствором аммиака и раствором натрия фосфорномолибденовокислого (натрия тетрагидро-12-молибдофосфата (7-), 19-водного) в 10%-й кислоте хлористоводородной.

Фенольные соединения определяли по реакциям с раствором железа хлоридом, 2%-м раствором свинца ацетата основного и 0,2%-м раствором квасцов железомолибденовых (реакция Роберта и Вуда).

Наличие флавоноидов подтверждали реакциями с 1%-м спиртовым раствором алюминия хлорида (реакция Гейдж) и порошком магния в кислоте хлористоводородной концентрированной (цианидиновая проба).

Сесквитерпеновые кислоты определяли по реакции со щелочным раствором гидроксиламина, кислотой хлористоводородной и раствором железа хлорида [13].

### Метод спектрофотометрии

Количественное определение фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту проводили согласно ФС.2.5.0084.18 «Мелиссы ле-

карственной трава» ГФ XIV издания, при длине волны 326 нм<sup>2</sup> [14].

Количественное определение флавоноидов проводили согласно ФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава» ГФ XIV издания, при длине волны 415 нм<sup>3</sup>.

Количественное определение суммы сесквитерпеновых кислот в пересчете на валереновую кислоту проводили согласно ФС 42-3865-99 «Настойка валерианы» ГФ XI издания при длине волны 512 нм. Метод основан на общегрупповой реакции с гидроксиламином, железа (III) хлоридом и хлористоводородной кислотой (гидроксамовая проба)<sup>4</sup> [15].

### Метод визуального титрования

Количественное определение аскорбиновой кислоты проводили согласно ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды» ГФ XIV издания с раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. В основе метода лежит окислительно-восстановительная реакция, происходит окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту, с появлением розовой окраски раствора<sup>5</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пробоподготовка заключалась в изготовлении водного извлечения из сбора в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» ГФ XIV в следующих условиях: режим настаивания – 15 минут на водяной бане, 45 минут при комнатной температуре; соотношение сырья и экстрагента 1:10 с учетом рассчитанного коэффициента водопоглощения сбора, который составил  $4,2 \pm 1,06$  мл/г<sup>6</sup>.

Установление критериев подлинности активных компонентов сбора проводили с помощью качественных реакций на основные группы биологически активных веществ (таблица 1).

На следующем этапе работы определено содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия, которое составило  $0,630 \pm 0,034$  % (таблица 2).

Содержание фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту составило  $0,451 \pm 0,010$  % (таблица 3).

<sup>2</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/1081/>. ссылка активна на 10.07.2022.

<sup>3</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/891/> Ссылка активна на 10.07.2022.

<sup>4</sup> Государственная фармакопея СССР. Вып 1. Общие методы анализа. Изд. XI. М.: Медицина; 1987. 334 с.

<sup>5</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/1439/> Ссылка активна на 10.07.2022.

<sup>6</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/147/> Ссылка активна на 10.07.2022.

**Таблица 1.** Качественный анализ седативного сбора на флавоноиды, фенольные соединения, сесквитерпеновые кислоты, аскорбиновую кислоту

**Table 1.** Qualitative analysis of sedative collection for flavonoids, phenolic compounds, sesquiterpene acids, ascorbic acid

Группа БАВ Group of biologically active substances	Флавоноиды Flavonoids	Фенольные соединения Phenolic compounds	Сесквитерпеновые кислоты Sesquiterpene acids	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid
Эффект реакции Reaction effect	Ярко-желтое окрашивание Bright yellow staining	Зеленое окрашивание Green staining	Красно-бурое окрашивание Red-brown staining	Синее окрашивание Blue staining

**Таблица 2.** Содержание флавоноидов в водном извлечении из сбора

**Table 2.** Content of flavonoids in water extract from the collection

№ п/п No. p/p	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин, % The sum of flavonoids in terms of rutin, %	$\bar{x} \pm \Delta x$
1	0,608	0,630 ± 0,034
2	0,623	
3	0,659	

**Таблица 3.** Содержание фенольных соединений в водном извлечении из сбора

**Table 3.** Content of phenolic compounds in aqueous extract from the collection

№ п/п No. p/p	Сумма фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту, % The sum of phenolic compounds in terms of rosmarinic acid, %	$\bar{x} \pm \Delta x$
1	0,4606	0,451 ± 0,010
2	0,4603	
3	0,4330	

Содержание сложных эфиров в пересчете на этиловый эфир валереновой кислоты составило 0,353 ± 0,003 % (таблица 4).

Содержание аскорбиновой кислоты в настое составило 0,190 ± 0,020 % (таблица 5).

**Таблица 4.** Содержание сложных эфиров в водном извлечении из сбора

**Table 4.** Content of esters in aqueous extract from the collection

№ п/п No. p/p	Содержание сложных эфиров в пересчете на этиловый эфир валереновой кислоты, % The content of esters in terms of ethyl ester of valerianic acid, %	$\bar{x} \pm \Delta x$
1	0,352	0,353 ± 0,003
2	0,357	
3	0,352	

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов качественных реакций в седативном сборе подтверждено наличие флавоноидов, фенольных соединений, сесквитерпеновых кислот и аскорбиновой кислоты, определено их со-

держание – показатель необходимый для установления разовой и суточной дозы сбора, рассчитан коэффициент водопоглощения сбора.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Таблица 5.** Содержание аскорбиновой кислоты в водном извлечении из сбора

**Table 5.** Content of ascorbic acid in water extract from the collection

№ п/п No. p/p	Содержание аскорбиновой кислоты, % Ascorbic acid content, %	$\bar{x} \pm \Delta x$
1	0,216	0,190 ± 0,020
2	0,188	
3	0,186	

## ЛИТЕРАТУРА

- Kosari-Nasab M., Shokouhi G., Ghorbanihaghjo A., Mesgari-Abbas M., Salari A.-A. Quercetin mitigates anxiety-like behavior and normalizes hypothalamus–pituitary–adrenal axis function in a mouse model of mild traumatic brain injury. *Behavioural Pharmacology*. 2019;30(2,3):282–289. DOI: 10.1097/fbp.0000000000000480.
- Ko Y.-H., Kim S.-K., Lee S.-Y., Jang C.-G. Flavonoids as therapeutic candidates for emotional disorders such as anxiety and depression. *Archives of Pharmacal Research*. 2020;43(11):1128–1143. DOI: 10.1007/s12272-020-01292-5.
- Базиков И. А., Мальцев А. Н., Бейер Э. В., Боев О. И., Седых О. И. Влияние опытного образца трансдермального седативного геля на психофизиологическое состояние экспериментальных животных. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019; 14(1):156–158. DOI: 10.14300/mnnc.2019.14004.
- Fang K., Li H. R., Chen X. X., Gao X. R., Huang L. L., Du A. Q., Jiang C., Li H., Ge J. F. Corrigendum: Quercetin Alleviates LPS-Induced Depression-Like Behavior in Rats via Regulating BDNF-Related Imbalance of Copine 6 and TREM1/2 in the Hippocampus and PFC. *Front. Pharmacol*. 2020;11:518. DOI: 10.3389/fphar.2020.00518.
- Godos J., Caraci F., Castellano S., Currenti W., Galvano F., Ferri R., Grosso G. Association Between Dietary Flavonoids Intake and Cognitive Function in an Italian Cohort. *Biomolecules*. 2020;10(9):1300. DOI: 10.3390/biom10091300.
- Буданцев А. Л., Приходько В. А., Варганова И. В., Оковитый С. В. Биологическая активность *Hypericum perforatum* L. (*Hypericaceae*): обзор. *Фармация и фармакология*. 2021;9(1):17–31. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-17-3.
- de la Garza A. L., Garza-Cuellar M., Silva-Hernandez I., Cardenas-Perez R., Reyes-Castro L., Zambrano E., Gonzalez-Hernandez B., Garza-Ocañas L., Fuentes-Mera L., Camacho A. Maternal flavonoids intake reverts depression-like behaviour in rat female offspring. *Nutrients*. 2019;11(3):572. DOI: 10.3390/nu11030572.

- Tayab M., Islam M., Chowdhury K., Tasnim F. Targeting neuroinflammation by polyphenols: A promising therapeutic approach against inflammation-associated depression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;147. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112668.
- Khan H., Perviz S., Sureda A., Nabavi S.M., Tejada S. Current standing of plant derived flavonoids as an antidepressant. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;119:176–188. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.052.
- Selek Ş., Eşrefoğlu M., Meral I., Bulut H., Caglar H. G., Sonuc G., Yildiz C., Teloglu E. S., Dogan N., Yuce B., Tiftik E., Bayındır N. Effects of *Oenothera biennis* L. and *Hypericum perforatum* L. extracts on some central nervous system myelin proteins, brain histopathology and oxidative stress in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biotech. Histochem.* 2019;94(2):75–83. DOI: 10.1080/10520295.2018.1482001.
- Курдюков Е. Е., Кузнецова А. В., Семенова Е. Ф., Моисеева И. Я. К вопросу стандартизации по содержанию флавоноидов листьев стевии как перспективного лекарственного растительного сырья. *Химия растительного сырья*. 2019;1:217–224. DOI: 10.14258/jcprm.2019014067.
- Куркин В. А., Зименкина Н. И. Особенности количественной оценки содержания флавоноидов в препаратах коры ореха черного. *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):31–43. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-31-43.
- Музычкина Р. А., Корулькин Д. Ю., Абилов Ж. А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. Алматы: Казак университеті; 2004. 288 с.
- Куркин В. А. Актуальные аспекты стандартизации сырья и препаратов, содержащих фенольные соединения. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(2):127–141. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-127-14.
- Антонова Н. П., Шефер Е. П., Калинин А. М., Семенова Н. Е., Прохвятилова С. С., Моргунов И. М. Современные подходы к стандартизации настойки валерианы по показателю «Количественное определение». *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):265–271. DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-4-265-271.
- de la Garza A. L., Garza-Cuellar M., Silva-Hernandez I., Cardenas-Perez R., Reyes-Castro L., Zambrano E., Gonzalez-Hernandez B., Garza-Ocañas L., Fuentes-Mera L., Camacho A. Maternal flavonoids intake reverts depression-like behaviour in rat female offspring. *Nutrients*. 2019;11(3):572. DOI: 10.3390/nu11030572.
- Tayab M., Islam M., Chowdhury K., Tasnim F. Targeting neuroinflammation by polyphenols: A promising therapeutic approach against inflammation-associated depression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;147. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112668.
- Khan H., Perviz S., Sureda A., Nabavi S.M., Tejada S. Current standing of plant derived flavonoids as an antidepressant. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;119:176–188. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.052.
- Selek Ş., Eşrefoğlu M., Meral I., Bulut H., Caglar H. G., Sonuc G., Yildiz C., Teloglu E. S., Dogan N., Yuce B., Tiftik E., Bayındır N. Effects of *Oenothera biennis* L. and *Hypericum perforatum* L. extracts on some central nervous system myelin proteins, brain histopathology and oxidative stress in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biotech. Histochem.* 2019;94(2):75–83. DOI: 10.1080/10520295.2018.1482001.
- Kurdyukov E. E., Kuznetsova A. V., Semenova E. F., Moiseeva I. Ya. On the issue of standardization of the content of flavonoids of stevia leaves as a promising medicinal plant material. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ja*. 2019;1:217–224. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019014067.
- Kurkin V. A., Zimenkina N. I. Features of quantitative estimation of flavonoid content in *Juglans nigra* L. barks preparations. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1):31–43. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-31-43.
- Muzychkina R. A., Korulkin D. Yu., Abilov Zh. A. Qualitative and quantitative analysis of the main groups of biologically active substances in medicinal plant materials and phytopreparations. Алматы: Kazakh University; 2004. 288 p. (In Russ.)
- Kurkin V. A. Relevant Aspects of Standardisation of Plant Raw Materials and Herbal Medicinal Products Containing Phenolic Compounds. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):127–141. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-127-14.
- Antonova N. P., Shefer E. P., Kalinin A. M., Semenova N. E., Prokhvatiлова S. S., Morgunov I. M. Current approaches to valerian tincture standardisation in terms of assay. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2019;9(4):265–271. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-4-265-271.
- Kosari-Nasab M., Shokouhi G., Ghorbanihaghjo A., Mesgari-Abbasi M., Salari A.-A. Quercetin mitigates anxiety-like behavior and normalizes hypothalamus–pituitary–adrenal axis function in a mouse model of mild traumatic brain injury. *Behavioural Pharmacology*. 2019;30(2, 3):282–289. DOI: 10.1097/fbp.0000000000000480.
- Ko Y.-H., Kim S.-K., Lee S.-Y., Jang C.-G. Flavonoids as therapeutic candidates for emotional disorders such as anxiety and depression. *Archives of Pharmacal Research*. 2020;43(11):1128–1143. DOI: 10.1007/s12272-020-01292-5.
- Bazikov I. A., Maltsev A. N., Beyer E. V., Boyev O. I., Sedykh O. I. The effect of the experimental sample of transdermal sedative gel on the psychophysiological state of experimental animals. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1):156–158. (In Russ.) DOI: 10.14300/mnnc.2019.14004.
- Fang K., Li H. R., Chen X. X., Gao X. R., Huang L. L., Du A. Q., Jiang C., Li H., Ge J. F. Corrigendum: Quercetin Alleviates LPS-Induced Depression-Like Behavior in Rats via Regulating BDNF-Related Imbalance of Copine 6 and TREM1/2 in the Hippocampus and PFC. *Front. Pharmacol.* 2020;11:518. DOI: 10.3389/fphar.2020.00518.
- Godos J., Caraci F., Castellano S., Currenti W., Galvano F., Ferri R., Grosso G. Association Between Dietary Flavonoids Intake and Cognitive Function in an Italian Cohort. *Biomolecules*. 2020;10(9):1300. DOI: 10.3390/biom10091300.
- Budantsev A. L., Prikhodko V. A., Varganova I. V., Okovityi S. V. Biological activity of *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): a review. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(1):17–31. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-17-31.

## REFERENCES

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-73-78](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-73-78)  
УДК 54.057:54.062:543.544.43



Оригинальная статья / Research article

## Разработка и валидирование условий определения остаточных органических растворителей – уксусной кислоты в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она

Е. Н. Люст✉, О. В. Бобровская, В. Л. Гейн

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

✉ Контактное лицо: Люст Елена Николаевна. E-mail: [elenalyust@mail.ru](mailto:elenalyust@mail.ru)

ORCID: Е. Н. Люст – <https://orcid.org/0000-0002-1943-2669>; О. В. Бобровская – <https://orcid.org/0000-0002-3394-9031>; В. Л. Гейн – <https://orcid.org/0000-0002-8512-0399>.

Статья поступила: 14.10.2022      Статья принята в печать: 28.11.2022      Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Для новых синтезируемых фармакологически активных соединений уже на стадии стандартизации необходима разработка методик определения показателей их качества, нормируемых фармакопейной статьёй на фармацевтические субстанции. Одним из таких показателей является остаточные органические растворители, для анализа которых пригодны хроматографические методы, например, газожидкостная хроматография.

**Цель.** Разработать условия определения остаточных органических растворителей – уксусной кислоты в новом фармакологически активном соединении (субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она), провести валидацию разработанной методики.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали субстанцию серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она, синтезированную в Пермской государственной фармацевтической академии. Исследование вели газохроматографическим методом (газо-жидкостной хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000», ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия).

**Результаты и обсуждение.** В настоящей работе отражены результаты по выбору газохроматографических условий определения остаточного органического растворителя (уксусной кислоты) в субстанции, данные условия оценены по показателям валидации, предъявляемым к аналитическим методикам.

**Заключение.** Разработана методика определения остаточного органического растворителя в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она, проведено валидирование методики.

**Ключевые слова:** субстанция, стандартизация, остаточные органические растворители, газо-жидкостная хроматография, валидация

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

**Вклад авторов.** О. В. Бобровская и В. Л. Гейн осуществили синтез субстанции. Е. Н. Люст провела газохроматографическое исследование, обработку данных, валидирование методики. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Люст Е. Н., Бобровская О. В., Гейн В. Л. Разработка и валидирование условий определения остаточных органических растворителей – уксусной кислоты в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4-1):73–78. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-73-78](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-73-78)

## Development and Validation of Conditions for the Determination of Residual Organic Solvents – Acetic Acid in the Silver Salt Substance 4-[4-(atsetilaminosul'fonil)fenil]-6-(4-bromfenil)-5-(2-nitrofenil)-3,5-digidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-ona

Elena N. Lyust✉, Olga V. Bobrovskaya, Vladimir L. Gein

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

✉ Corresponding author: Elena N. Lyust. E-mail: [elenalyust@mail.ru](mailto:elenalyust@mail.ru)

ORCID: Elena N. Lyust – <https://orcid.org/0000-0002-1943-2669>; Olga V. Bobrovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-3394-9031>; Vladimir L. Gein – <https://orcid.org/0000-0002-8512-0399>.

Received: 14.10.2022      Revised: 28.11.2022      Published: 27.12.2022

© Люст Е. Н., Бобровская О. В., Гейн В. Л., 2022

© Lyust E. N., Bobrovskaya O. V., Gein V. L., 2022

## Abstract

**Introduction.** For new synthesized pharmacologically active compounds, already at the stage of standardization, it is necessary to develop methods for determining their quality indicators, normalized by a pharmacopoeial article for pharmaceutical substances. One of these indicators is the residual organic solvents, for the analysis of which chromatographic methods are suitable, for example, gas-liquid chromatography.

**Aim.** To develop conditions for the determination of residual organic solvents - acetic acid in a new pharmacologically active compound (substance of silver salt 4-[4-(acetilaminosulfonyl)fenil]-6-(4-bromofenil)-5-(2-nitrofenil)-3,5-dигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она), to validate the developed method.

**Materials and methods.** The substance of the silver salt 4-[4-(acetilaminosulfonyl)fenil]-6-(4-bromofenil)-5-(2-nitrofenil)-3,5-dигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она, synthesized at the Perm State Pharmaceutical Academy. The study was carried out by the gas chromatographic method (gas-liquid chromatograph Chromatec-Crystal 5000, JSC SDO «Chromatec», Russia).

**Results and discussion.** This paper reflects the results of the choice of gas chromatographic conditions for determining the residual organic solvent (acetic acid) in the substance, these conditions are evaluated according to the validation indicators required for analytical methods.

**Conclusion.** A procedure has been developed for determining the residual organic solvent in the substance of the silver salt 4-[4-(acetilaminosulfonyl)fenil]-6-(4-bromofenil)-5-(2-nitrofenil)-3,5-dигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она, the methodology was validated.

**Keywords:** substance, standardization, residual organic solvents, gas-liquid chromatography, validation

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

**Contribution of the authors.** Olga V. Bobrovskaya and Vladimir L. Gein carried out the synthesis of the substance. Elena N. Lyust conducted a gas chromatographic study, data processing, method validation. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Lyust E. N., Bobrovskaya O. V., Gein V. L. Development and validation of conditions for the determination of residual organic solvents – acetic acid in the silver salt substance 4-[4-(acetilaminosul'fonil)fenil]-6-(4-bromofenil)-5-(2-nitrofenil)-3,5-dигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она. *Drug development & registration*. 2022;11(4-1):73–78. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-73-78](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-73-78)

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что реакции соле- и комплексообразования приводят к получению металлосодержащих органических соединений с высоким биологическим действием и являются одними из эффективных путей повышения и изменения направленности фармакологических эффектов. В результате многолетних исследований в области синтеза новых высокоэффективных, безопасных биологически активных соединений на основе химических превращений сульфаниламидов с метиловыми эфирами ацилпировиноградных кислот [1–12] сотрудниками кафедры общей и органической химии Пермской государственной фармацевтической академии были получены натриевые и серебряные соли 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-N-[4-(N-R-сульфамоил)фенил]бут-2-енамидов, 5-арил(t-бутил)-N-[4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамоил]фенил]-1-фенилпирразол-3-карбоксамидов, метил (2Z)-4-арил-4-оксо-2-[[4-(N-R-сульфамоил)фенил]амино]бут-2-еноатов, пирроло [3,4-с]пиразол-3-онов [4, 6, 8, 10–12].

Особый интерес представляет серебряная соль 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она, обладающая высокой антибактериальной и противогрибковой активностью [11, 12], которая синтезирована по методике [11]. Структура соединения подтверждена данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H, ИК- и масс-спектрометрии [11].

Обязательным требованием для фармацевтических субстанций является определение остаточных количеств органических растворителей, т. е. летучих веществ, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата и полностью не удаляются после завершения технологического процесса. Данные растворители классифицированы на 1, 2, 3 классы токсичности<sup>1,2</sup>.

Для субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она из остаточных органических растворителей характерно содержание уксусной кислоты и этанола, которые согласно ОФС.1.1.0008.15. «Остаточные органические растворители» относят к растворителям 3 класса токсичности. Чаще всего для определения остаточного содержания органических растворителей при-

<sup>1</sup> ОФС.1.1.0008.15. Остаточные органические растворители: взамен ОФС 42-0057-07. Государственная Фармакопея РФ 14-е изд. Т. 1. 2018. Доступно по: [http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_1/HTML/203/index.html#zoom=z](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/203/index.html#zoom=z). Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>2</sup> ОФС.1.1.0006.15. Фармацевтические субстанции. Государственная Фармакопея РФ 14-е изд. Т. 1. 2018. Доступно по: [http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14\\_1/HTML/176/index.html#zoom=z](http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/176/index.html#zoom=z). Ссылка активна на 20.10.2022.

меняют хроматографические методы исследования, такие как газожидкостная хроматография.

**Цель работы** заключается в разработке и валидации условий определения содержания уксусной кислоты в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она методом газожидкостной хроматографии.

В ходе работы установлено содержание уксусной кислоты в субстанции, не превышающих предельно допустимых концентраций, разработаны газохроматографические условия определения уксусной кислоты в субстанции, проведено валидирование методики.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объект исследования

Субстанция серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она (субстанция серебряной соли пирролопиразола).

### Оборудование

Газо-жидкостной хроматограф «Хроматэк-Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия).

### Используемые реактивы

Диметилсульфоксид (х.ч., АО «ВЕКТОН», Россия), диметилформамид (х.ч., АО «ВЕКТОН», Россия), ГСО 8462-2003 стандартный образец состава раствора уксусной кислоты (аттестованное значение 1,00 мг/см<sup>3</sup>, ЭАА «Эко-Аналитика», Россия, 25.05.2022 г., срок годности 3 года).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования по установлению оптимальных условий газохроматографического определения уксусной кислоты сводились к выбору типа колонки (неподвижная жидкая фаза) и режима программирования температуры анализа, выбора растворителя для субстанции.

В эксперименте использована колонка полярная HP-FFAP, чаще всего применяемая для хроматографирования летучих органических веществ. В качестве растворителя применены диметилформамид и диметилсульфоксид.

В ходе экспериментов установлено, что при хроматографировании разделение уксусной кислоты и растворителя диметилформамида не представляется возможным, поэтому в дальнейших экспериментах был использован в качестве растворителя диметилсульфоксид, что позволило достигнуть удовлетворительного разделения компонентов. Таким образом, нами предложены следующие условия хроматографирования уксусной кислоты: колонка капиллярная HP-FFAP; температура термостата колон-

ки начальная – 120 °С, далее со скоростью нагрева 15 °С/мин до температуры 220 °С; температура детектора – 230 °С; температура испарителя – 180 °С; объем вводимой пробы – 1 мкл. В данных условиях время анализа в среднем составило 20,0 минут. Время выхода уксусной кислоты в среднем составило 9,9 мин., диметилсульфоксида – 11,6 мин.

Далее проводили валидирование разработанных условий по показателям: специфичность, линейность, правильность, предел количественного определения, прецизионность (в условиях повторяемости).

Для оценки специфичности сравнивали результаты анализа модельной смеси с концентрацией уксусной кислоты 1 % в диметилсульфоксиде и непосредственно растворителя. Полученные результаты проиллюстрированы на рисунке 1. Анализ полученных хроматограмм показал, что уксусная кислота и диметилсульфоксид имеют отличные времена удерживания, а посторонние примеси субстанции не мешают достоверному определению уксусной кислоты.

Линейность разработанных условий проверяли для 7 уровней концентрации определяемого вещества в диапазоне 0,04–0,6 % уксусной кислоты в пробе (13–130 %). У полученных хроматограмм оценивали площадь хроматографического пика. Полученная зависимость в анализируемом диапазоне линейна и описывается уравнением:

$$S = 3,110 \times 10^{04} \times C,$$

где  $S$  – площадь хроматографического пика;  $C$  – концентрация уксусной кислоты, коэффициент корреляции  $\geq 0,99$  ( $R^2 = 0,999$ ) (рисунок 2).

Определение правильности методики оценивали на модельных растворах с известным содержанием уксусной кислоты: на уровнях 80, 100 и 120 % в трех повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Значения (содержание уксусной кислоты в пробе), принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике, что свидетельствует о правильности методики.

Предел количественного определения – это наименьшее количество вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики. Данная характеристика является необходимой для методик оценки малых количеств веществ в образце, в том числе для оценки содержания примесей. Предел количественного определения (ПКО) вычисляли по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту градуировочного графика, где

$$\text{ПКО} = 10 \times S/b,$$

где  $S$  – стандартное отклонение аналитического сигнала;  $b$  – угловой коэффициент градуировочного графика. В результате вычислений ПКО уксусной кислоты в данных условиях равен 0,004 %.

Определение прецизионности (в условиях повторяемости (сходимость) проводили по результатам шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному (100%). Повторяемость оценивали по результатам анализа одного аналитика, полученных в одной лаборатории. Внутрिलाбораторная прецизионность исследовалась по результатам двух аналитиков, полученных в одной лаборатории в разные дни. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Различия между результатами определений, проведенных двумя аналитиками, статистически незначимы, так как величина расчетного значения критерия Фишера (1,03) меньше табличного значения, которое составляет 5,05 для  $P = 0,95$  (доверительная вероятность),  $f_1$  и  $f_2$  (число степеней свободы) = 5.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика определения содержания уксусной кислоты методом газожидкостной хроматографии в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бромфенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-она. Проведено валидирование методики: методика линейна в аналитической области, специфична, оценена по показателям правильность и прецизионность (повторяемость (сходимость), внутрिलाбораторная прецизионность).

Содержание остаточного органического растворителя (уксусной кислоты) в субстанции серебряной соли 4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-6-(4-бром-

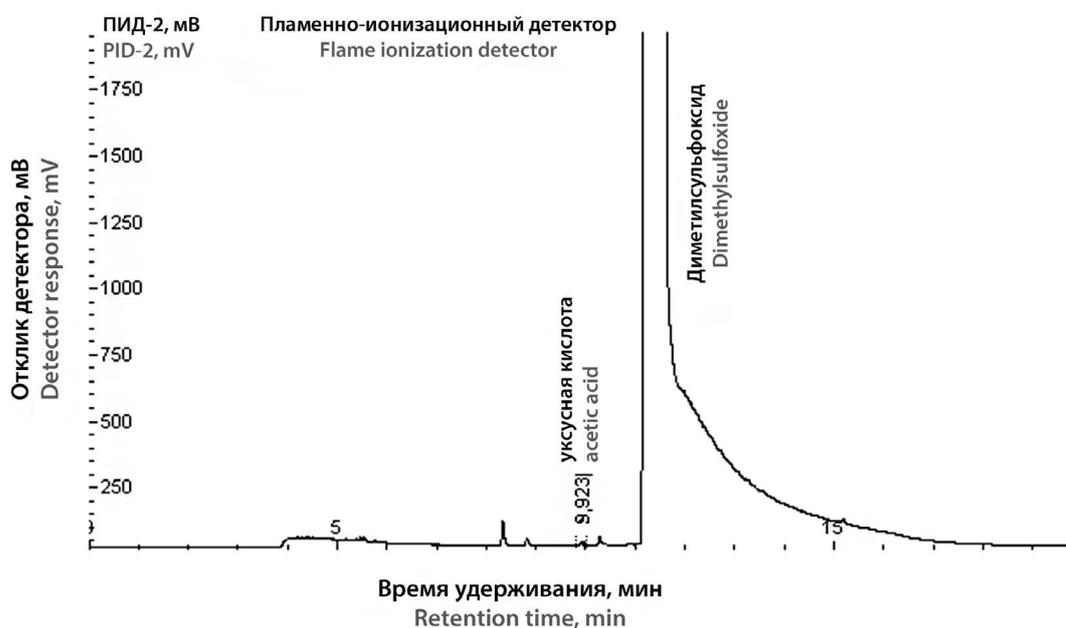


Рисунок 1. Хроматограмма субстанции серебряной соли пирролопиразола (растворитель диметилсульфоксид)

Figure 1. Chromatogram of the substance of the silver salt of pyrrolopyrazole (dimethylsulfoxide solvent)



Рисунок 2. Градуировочная характеристика зависимости площади хроматографического пика от содержания уксусной кислоты в растворе (растворитель диметилсульфоксид)

Figure 2. Calibration characteristic of the dependence of the area of the chromatographic peak on the content of acetic acid in solution (dimethylsulfoxide solvent)

Таблица 1. Результаты определения правильности методики газохроматографического исследования уксусной кислоты

Table 1. Results of determining the correctness of the gas chromatographic study of acetic acid

Уровень концентрации уксусной кислоты, % The concentration of acetic acid, %	«Истинное» содержание уксусной кислоты в пробе, % «True» content of acetic acid in the sample, %	Площадь пика уксусной кислоты Peak area for acetic acid	Найденное содержание уксусной кислоты в пробе, % Found content of acetic acid in the sample, %	Открываемость, % Opening, %
80	0,100	321,11	0,100	100,00
		318,02	0,099	99,00
		324,71	0,101	101,00
100	0,300	972,48	0,302	100,67
		975,43	0,303	101,00
		972,75	0,303	101,00
120	0,500	1637,45	0,509	101,80
		1570,85	0,489	97,80
		1593,35	0,496	99,20
Статистическая обработка результатов Statistical processing of results				
$\bar{X}_{\text{открываемости}}^*$ , % $\bar{X}_{\text{of open}}^*$ , %	SD ( $S_{\sigma}$ )**	$\Delta\bar{x}^{***}$ ( $P = 0,95; n = 9$ )	$\epsilon_{\text{ср.}}^{****}$ , %	t-критерий Стьюдента, расчетное
100,16	1,27	1,10	1,09	0,65
t-критерий Стьюдента ( $P = 95\%$ и $f = 8$ ), табличное – 2,31				

**Примечание.** \* Средний процент открываемости.

\*\* Стандартное отклонение среднего результата.

\*\*\* Доверительный интервал.

\*\*\*\* Относительная ошибка среднего результата.

**Note.** \* Average open rate.

\*\* Standard deviation of mean result.

\*\*\* Confidence limit.

\*\*\*\* Relative error of mean result.

фенил)-5-(2-нитрофенил)-3,5-дигидропирроло[3,4-с] пиразол-3-она, определенное по разработанной методике, составило от 0,13 до 0,34 %.

Таблица 2. Статистическая обработка результатов газохроматографического определения уксусной кислоты при оценке повторяемости (сходимости)

Table 2. Statistical processing of the results of gas chromatographic determination of acetic acid in the evaluation of repeatability (convergence)

Площадь пика уксусной кислоты Peak area for acetic acid	Содержание уксусной кислоты, % Acetic acid content, %	$\bar{x}^*$	SD ( $S_{\sigma}$ )**	RSD***, % ( $S_{\sigma, \%}$ )
980,02	0,305	0,301	0,003	1,110
973,20	0,303			
972,84	0,302			
958,70	0,298			
971,89	0,302			
953,09	0,296			

**Примечание.** \* Результат средний.

\*\* Стандартное отклонение среднего результата.

\*\*\* Относительное стандартное отклонение среднего результата.

**Note.** \* Average result.

\*\* Standard deviation of mean result.

\*\*\* Relative standard deviation of the mean.

Таблица 3. Оценка внутрилабораторной прецизионности методики газохроматографического определения уксусной кислоты

Table 3. Evaluation of the intralaboratory precision of the method for the gas chromatographic determination of acetic acid

№	Найденное содержание уксусной кислоты, % Found content of acetic acid, %	
	Результаты 1-го аналитика The results of the first analyst	Результаты 2-го аналитика The results of the second analyst
1	0,305	0,295
2	0,303	0,298
3	0,302	0,302
4	0,298	0,302
5	0,302	0,300
6	0,296	0,304
$\bar{x}^*$	0,3010	0,3002
SD** ( $S_{\sigma}$ )	0,0033	0,0033
RSD***, % ( $S_{\sigma, \%}$ )	1,11	1,08

**Примечание.** \* Результат средний.

\*\* Стандартное отклонение среднего результата.

\*\*\* Относительное стандартное отклонение среднего результата.

**Note.** \* Average result.

\*\* Standard deviation of mean result.

\*\*\* Relative standard deviation of the mean.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гейн В. Л., Бобровская О. В., Русских А. А., Петухова Н. Н. Синтез 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-*N*-[4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил]бут-2-енамидов. *Журнал общей химии*. 2018;88(2):338–341. DOI: 10.1134/S1070363218020238.
2. Гейн В. Л., Замараева Т. М., Горгопина Е. В., Игидов Н. М., Бобровская О. В., Дмитриев М. В. Синтез и строение (*Z*)-*N*-арил-2-гидрокси-4-оксо-4-фенилбут-2-енамидов. *Журнал общей химии*. 2018;88(4):686–689. DOI: 10.1134/S1070363218040321.
3. Гейн В. Л., Бобровская О. В., Дмитриев М. В., Махмудов Р. Р., Белоногова В. Д. Синтез и биологическая активность соединений, полученных на основе взаимодействия метиловых эфиров арилпирроиноградных кислот с сульфадимидином. *Журнал общей химии*. 2018;88(6):914–921. DOI: 10.1134/S1070363218060087.
4. Гейн В. Л., Бобровская О. В., Русских А. А., Новикова В. В., Гейн О. Н., Карпенко Ю. Н., Чащина С. В., Дмитриев М. В., Янкин А. Н. Синтез и биологическая активность 5-арил-*N*-[4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил]-1-фенилпирозол-3-карбоксамидов и их солей. *Журнал общей химии*. 2019;89(4):542–551. DOI: 10.1134/S0044460X19040073.
5. Гейн В. Л., Бобровская О. В., Русских А. А., Дмитриев М. В., Янкин А. Н. Синтез метил 4-арил-4-оксо-2-[4-[(1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фениламино]бут-2-еноатов и их взаимодействие с нингидрином. *Журнал органической химии*. 2019;55(5):693–699. DOI: 10.1134/S0514749219050057.
6. Гейн В. Л., Бобровская О. В., Машкина Е. А., Новикова В. В., Махмудов Р. Р., Янкин А. Н., Данилов С. Е., Хволис Е. А., Белоногова В. Д., Гуляев Д. К. Синтез и противомикробная активность метил 4-арил-2-[4-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)сульфамойл]фениламино]-4-оксобут-2-еноатов и их серебряных солей. *Журнал общей химии*. 2020;90(5):723–729. DOI: 10.31857/S0044460X20050108.
7. Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Yankin A. N., Dmitriev M. V., Bunev A. S., Gein V. L. Straightforward synthesis of novel spiroether derivatives. *Synthetic Communications*. 2021;51(11):1731–1741. DOI: 10.1080/00397911.2021.1903930.
8. Гейн О. Н., Бобровская О. В., Гейн С. В., Гейн В. Л. Иммунобиологическая и противовоспалительная активность натриевых солей пирроло[3,4-*c*]пирозол-3-онов и пирозол-3-карбоксамидов в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(2):21–25. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-2-21-25.
9. Гейн В. Л., Назарец О. В., Романова А. В., Бобровская О. В., Махмудов Р. Р. Синтез и анальгетическая активность метил-2-[(2*Z*)-4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еноил]аминобензоатов. *Журнал общей химии*. 2022;92(8):1163–1167. DOI: 10.31857/S0044460X22080017.
10. Новикова В. В., Русских А. А. Исследование противогрибковой активности нового соединения ряда серебряных солей пирозолкарбоксамидов *in vitro*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;2(23):92–95.
11. Гейн В. Л., Бобровская О. В., Селиверстов Г. В., Новикова В. В., Махмудов Р. Р. Серебряные соли 3,4-диарил-5-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пирозол-6-онов, проявляющие противогрибковую активность. Патент РФ на изобретение № RU 2706357 С1. 18.11.2019. Доступно по: <https://www.fips.ru/publication-web/publications/document?type=doc&tab=IZPM&id=45B52611-1395-49F3-90AF-424E1759270E/> Ссылка активна на 20.10.2022.
12. Новикова В. В., Бобровская О. В., Гейн В. Л., Селиверстов Г. В., Люст Е. Н., Махмудов Р. Р. Оценка противогрибковой и антибактериальной активности серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-*c*]пирозол-3-онов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(9):34–38. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38.
2. Gein V. L., Zamaraeva T. M., Gorgopina E. V., Igidov N. M., Bobrovskaya O. V., Dmitriev M. V. Synthesis and Structure (*Z*)-*N*-Aryl-2-hydroxy-4-oxo-4-phenylbut-2-enamides. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(4):832–835. (In Russ.) DOI:10.1134/S1070363218040321.
3. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Dmitriev M. V., Makhmudov R. R., Belonogova V. D. Synthesis and Biological Activity of Compounds Obtained by Reacting Methyl Aroylpyruvates with Sulfadimidine. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(6):1095–1102. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1070363218060087.
4. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Novikova V. V., Gein O. N., Karpenko Yu. N., Chashchina S. V., Dmitriev M. V., Yankin A. N. Synthesis and Biological Activity of 5-Aryl-*N*-[4-[(1,3-thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenyl]-1-phenyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamides and Their Salts. *Russian Journal of General Chemistry*. 2019;89(4):680–688. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1070363219040078.
5. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Dmitriev M. V., Yankin A. N. Synthesis of Methyl 4-Aryl-4-oxo-2-[4-[(1,3-thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenylamino]but-2-enoates and Their Reactions with Ninhydrin. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2019;55(5):602–607. (In Russ.) DOI: 10.1134/S107042801905004X.
6. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Mashkina E. A., Novikova V. V., Makhmudov R. R., Yankin A. N., Danilov S. E., Hvolis E. A., Belonogova V. D., Gulyaev D. K. Synthesis and Antimicrobial Activity of Methyl (2*Z*)-4-aryl-2-[4-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl]phenylamino]-4-oxobut-2-enoates and Their Silver Salts. *Russian Journal of General Chemistry*. 2020;90(5):822–826. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1070363220050102.
7. Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Yankin A. N., Dmitriev M. V., Bunev A. S., Gein V. L. Straightforward synthesis of novel spiroether derivatives. *Synthetic Communications*. 2021;51(11):1731–1741. DOI: 10.1080/00397911.2021.1903930.
8. Gein O. N., Bobrovskaya O. V., Gein S. V., Gein V. L. Immunobiological and anti-inflammatory activity of sodium salts of pyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-ones and pyrazol-3-carboxamides in experiment. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(2):21–25. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-2-21-25.
9. Gein V. L., Nazarets O. V., Romanova A. V., Bobrovskaya O. V., Makhmudov R. R. Synthesis and Analgesic Activity of Methyl 2-[(2*Z*)-4-Aryl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoyl]amino]benzoates. *Russian Journal of General Chemistry*. 2022;92(8):1367–1370. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1070363222080011.
10. Novikova V. V., Russkikh A. A. The investigation of antifungal activity of new silver salt of pyrazol-3-carboxamides *in vitro*. *Drug development & registration*. 2018;2(23):92–95. (In Russ.).
11. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Seliverstov G. V., Novikova V. V., Makhmudov R. R. Silver salts of 3,4-diaryl-5-[4-(acetylaminosulfonyl)phenyl]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-6-ones, exhibiting antifungal activity. Patent RU №2706357 C1. 18.11.2019. Available at: <https://www.fips.ru/publication-web/publications/document?type=doc&tab=IZPM&id=45B52611-1395-49F3-90AF-424E1759270E/> Accessed: 20.10.2022. (In Russ.)
12. Novikova V. V., Bobrovskaya O. V., Gein V. L., Seliverstov G. V., Lyust E. N., Makhmudov R. R. Assessing the antifungal and antibacterial activity of silver salts of 5,6-diaryl-4-[4-(acetylaminosulfonyl)-phenyl]-3,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-ones. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2021;84(9):34–38. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38.

## REFERENCES

1. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Petukhova N. N. Synthesis of 4-Aryl-2-hydroxy-4-oxo-*N*-[4-[(1,3-thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenyl]but-2-enamides. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(2):334–337. (In Russ.) DOI: 10.1134/S1070363218020238.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-79-84](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-79-84)  
УДК 615.322:615.246.2



Оригинальная статья / Research article

## Сезонные изменения сорбционной активности полисахаридов сосны обыкновенной шишек (*Pinus sylvestris* L.)

Д. К. Гуляев✉, В. Д. Белоногова

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

✉ Контактное лицо: Гуляев Дмитрий Константинович. E-mail: dkg2014@mail.ru

ORCID: Д. К. Гуляев – <https://orcid.org/0000-0001-9464-1869>; В. Д. Белоногова – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 29.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** В настоящее время остро стоит проблема повышения эффективности использования лесных ресурсов. Одним из таких ресурсов являются шишки сосны обыкновенной, которые остаются на местах рубки леса. Полисахариды сосны обыкновенной шишек обладают выраженной сорбционной активностью, однако остается не ясным влияет ли на сорбционную активность, в каком месяце проводилась заготовка сырья.

**Цель.** Исследование содержания, сорбционной активности и молекулярной массы водорастворимых полисахаридов сосны обыкновенной шишек в разные сезоны года.

**Материалы и методы.** Водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПК) сосны обыкновенной шишек получали по методике, основанной на известной схеме разделения углеводов по Бэйли с соавторами. ВРПК получали из образцов сосны обыкновенной шишек, заготовленных с июля по март. Определение содержания ВРПК сосны обыкновенной шишек проводили спектрофотометрически, модифицированным антрон-серным методом Дрейвуда. Определение сорбционной активности полисахаридов проводили по метиленовому синему. Молекулярную массу полисахаридов определяли вискозиметрическим методом.

**Результаты и обсуждение.** Определено содержание ВРПК в шишках сосны обыкновенной с июля по март. Самый высокий выход ВРПК отмечен в зимний период ( $3,24 \pm 0,31$  %), а наименьший – в летний ( $0,46 \pm 0,01$  %). Исследована сорбционная активность ВРПК шишек сосны обыкновенной по метиленовому синему с июля по март *in vitro*. Установлено, что наибольшей сорбционной активностью ВРПК обладает в октябре ( $230,69 \pm 4,18$  %) и ноябре ( $243,30 \pm 9,43$  %). Сорбционная активность ВРПК превышает активность препаратов сравнения угля активированного ( $230,9 \pm 2,34$  мг/г) и диоксида кремния коллоидного («Полисорб МП») ( $211,5 \pm 1,87$  мг/г). Определена средняя молекулярная масса ВРПК шишек сосны обыкновенной с июля по март. Средняя молекулярная масса ВРПК находится в пределах от 6 872,27 до 21 598,06. Установлена зависимость сорбционной активности ВРПК сосны обыкновенной шишек от молекулярной массы.

**Заключение.** Водорастворимый полисахаридный комплекс сосны обыкновенной шишек, полученный в разное время года, обладает разной сорбционной активностью, которая зависит от молекулярной массы полисахарида. Наибольшее содержание и сорбционная активность ВРПК шишек сосны обыкновенной совпадает с периодом заготовки древесины, что обуславливает практическое применение шишек и перспективу дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** сосна обыкновенная, сосновые, полисахариды, сорбционная активность, молекулярная масса

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

**Вклад авторов.** Д. К. Гуляев планирование и выполнение эксперимента, оформление списка литературы, написание статьи. В. Д. Белоногова планирование эксперимента, обсуждение результатов и написание статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Гуляев Д. К., Белоногова В. Д. Сезонные изменения сорбционной активности полисахаридов сосны обыкновенной шишек (*Pinus sylvestris* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):79–84. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-79-84](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-79-84)

## Seasonal Changes in the Sorption Activity of Water-soluble Polysaccharides in Scotch Pine Cones (*Pinus sylvestris* L.)

Dmitry K. Gulyaev✉, Valentina D. Belonogova

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

✉ Corresponding author: Dmitry K. Gulyaev. E-mail: dkg2014@mail.ru

ORCID: Dmitry K. Gulyaev – <https://orcid.org/0000-0001-9464-1869>; Valentina D. Belonogova – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>.

Received: 14.10.2022

Revised: 29.11.2022

Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** Currently, there is much tension around the issue of increasing the efficiency of use of forest resources. One of these resources are scotch pine cones, which remain at the felling areas. Polysaccharides of scotch pine cones have a significant sorption activity; however, it remains unclear does the month, when raw materials were collected, affect the sorption activity.

© Гуляев Д. К., Белоногова В. Д., 2022

© Gulyaev D. K., Belonogova V. D., 2022

**Aim.** The research of the content, sorption activity and molecular weight of water-soluble polysaccharides of scotch pine cones in different seasons of the year.

**Materials and methods.** Water-soluble polysaccharide complex (WSPC) of scotch pine cones was obtained with a method based on the well-known scheme for the carbohydrates separation according to Bailey et al. WSPC was obtained from the samples of scotch pine cones collected from July till March. Determination of the content of scots pine cones WSPC was spectrophotometrically carried out, with the modified Draywood anthrone-sulfurous method. The sorption activity of polysaccharides was determined by the methylene blue. The molecular weight of polysaccharides was identified by the viscosimetric method.

**Results and discussion.** The content of WSPC in scotch pine cones from July till March was identified. The highest yield of WSPC was registered in winter ( $3.24 \pm 0.31\%$ ), and the lowest in summer ( $0.46 \pm 0.01\%$ ). The sorption activity of scotch pine cones WSPC in terms of methylene blue from July till March was researched *in vitro*. It was found that WSPC has the highest sorption activity in October ( $230.69 \pm 4.18\%$ ) and November ( $243.30 \pm 9.43\%$ ). The WSPC sorption activity is above the activity of standard medications: absorbent carbon ( $230.9 \pm 2.34$  mg/g) and colloidal silicon dioxide ("Polisorb MP") ( $211.5 \pm 1.87$  mg/g). The average molecular weight of scotch pine cones WSPC from July till March was determined. The average molecular weight of WSPC is in the range from 6 872,27 to 21 598,06. The dependence of the scotch pine cones WSPC sorption activity on the molecular weight was registered.

**Conclusion.** The water-soluble polysaccharide complex of scotch pine cones, obtained at different seasons, has different sorption activity, which depends on a polysaccharide molecular weight. The highest content and sorption activity of scotch pine cones WSPC matches with the period of wood production, which stipulates a practical use of cones and directions for future research.

**Keywords:** scotch pine, pinaceae, polysaccharides, sorption activity, molecular weight

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

**Contribution of the authors.** Dmitry K. Gulyaev planning and execution of the experiment, registration of the list of references, writing the article. Valentina D. Belonogova planning the experiment, discussing the results and writing the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Gulyaev D. K., Belonogova V. D. Seasonal changes in the sorption activity of water-soluble polysaccharides in scotch pine cones (*Pinus sylvestris* L.). *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):79–84. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-79-84](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-79-84)

## ВВЕДЕНИЕ

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) семейства сосновых (*Pinaceae*) – является одной из главных лесообразующих пород на территории Российской Федерации. Сосна обыкновенная является источником получения древесины для строительства и других нужд. После заготовки древесины на местах рубок остается огромное количество древесных отходов, включающих: древесную зелень, шишки, корни, пни.

Шишки разных видов сосны являются источником биологически активных веществ. В шишках сосны найдены эфирные масла, фенольные соединения, полисахариды, сапонины и другие группы веществ [1–4]. Богатый состав обуславливает присутствие разного рода фармакологической активности у экстрактов и вытяжек из шишек сосны [5–8].

Одной из групп биологически активных веществ, обуславливающих проявление лечебного действия, являются полисахариды [9–13]. Установлено, что водорастворимый полисахаридный комплекс шишек сосны обыкновенной состоит из галактуроновой кислоты и арабинозы. L-арабиноза – преобладающий моносахарид [14, 15]. Также, в водорастворимом полисахаридном комплексе сосны обыкновенной обнаружено 37,13 % урсонных кислот, молекулярная масса, которых равна 4239,2 кДа. Выделенные гетерополисахариды состояли из D-рибозы, L-рамнозы,

L-арабинозы, D-ксилозы, D-маннозы, D-глюкозы и D-галактозы [15].

В нашем прошлом исследовании мы определяли состав и сорбционную активность полисахаридных фракций древесной зелени и шишек сосны обыкновенной. Установлено, что водорастворимый полисахаридный комплекс сосны обыкновенной шишек обладает высокой сорбционной активностью, превышающей действие препаратов сравнения [14]. Представляет интерес продолжение исследования их сорбционной активности и факторов, влияющих на выраженность сорбционного действия.

Если вести заготовку шишек сосны на местах рубки леса, то необходимо исследовать влияние сезонов года на уровень сорбционной активности водорастворимого полисахаридного комплекса. Наиболее интенсивно заготовку древесины проводят в осенний и зимний периоды. Необходимо установить совпадают ли эти сроки с наибольшей сорбционной активностью водорастворимых полисахаридов сосны обыкновенной шишек.

Сорбционная и комплексообразующая способность полисахаридов зависит от содержания свободных карбоксильных групп, поскольку они в результате диссоциации в растворе несут на себе отрицательный заряд и определяют плотность заряда полимера, следовательно, силу и способ связывания катионов. В связи с этим, у полимерных цепей с большей молеку-

лярной массой заряд на поверхности молекулы будет более значительным [16].

**Цель** – исследование содержания, сорбционной активности и молекулярной массы водорастворимых полисахаридов сосны обыкновенной шишек в разные сезоны года.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырьем для получения водорастворимого полисахаридного комплекса (ВРПК) являлись шишки сосны обыкновенной. Сбор образцов сырья проводили на территории Ильинского района Пермского края в смешанном лесу, в период с июля по декабрь 2021 года и с января по март 2022 года. Сбор сырья проводили с 10–15 деревьев. Шишки высушены воздушно-теплым способом и хранились до исследования в сухом, хорошо проветриваемом помещении.

Водорастворимый полисахаридный комплекс сосны обыкновенной шишек получали по методике, основанной на известной схеме разделения углеводов по Бэйли с соавторами [17]. Навеску воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц диаметром 2 мм. Для удаления низкомолекулярных сахаров и фенольных соединений, навеску сырья около 100 г предварительно экстрагировали спиртом этиловым 95 % (ООО «Константа-Фарм М», Россия) в аппарате Сокслета в течении 1,5 часов.

Шрот после извлечения низкомолекулярных сахаров и фенольных соединений, экстрагировали водой очищенной в соотношении 1:20 при температуре 80 °С в течении 90 минут. Извлечение упаривали под вакуумом и осаждали водорастворимый полисахаридный комплекс трехкратным количеством спирта 95 %. Осажденные полисахариды трижды промывали спиртом этиловым 90 %.

Определение содержания ВРПК сосны обыкновенной шишек проводили спектрофотометрически, модифицированным антрон-серным методом Дрейвуда [18]. Навеску около 10 г (точная навеска) воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц 2 мм, экстрагировали спиртом этиловым 90 % в аппарате Сокслета в течение 1,5 часов, для удаления низкомолекулярных сахаров.

Остаток сырья после спиртовой экстракции обрабатывали водой очищенной дважды по 100 мл при нагревании около 100 °С, в течении 1 часа. Извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили до метки тем же экстрагентом (раствор А). 2 мл раствора А переносили в центрифужную пробирку, прибавляли 8 мл 95%-го спирта этилового, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 минут. После охлаждения содержимое пробирки центрифугировали в течение 10 мин со скоростью вращения 3000 оборотов в минуту на лабораторной центрифуге ОПн-12 (ОАО «ТНК «Дастан», Киргизия). Надосадочную жидкость сливали, а осадок продували в пробирке горячим воздухом до удаления следов этанола. К осадку приливали 4 мл

0,2%-й раствор антрона (CAS № 90–44–8, АО «ВЕК-ТОН», Россия) в кислоте серной концентрированной (CAS № 7664–93–9, ООО «Сигма Тек», Россия) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Содержимое пробирки после охлаждения переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл 95%-м спиртом этиловым и доводили до метки тем же растворителем (раствор Б).

Оптическую плотность растворов Б измеряли на спектрофотометре СФ 2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) при длине волны 430 нм (раствор Б) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 4 мл 0,2%-й раствор антрона в кислоте серной концентрированной, выдержанный в тех же условиях, что и опытную смесь.

Содержание групп углеводов (X, %) в пересчете на доминирующий моносахарид и абсолютно сухое сырье рассчитывают по формуле (1):

$$x = \frac{A \cdot k^V \cdot 0,91}{m \cdot E} \cdot \frac{100}{100 - W},$$

где  $A$  – оптическая плотность исследуемого раствора;  $k^V$  – коэффициент разбавления (2500 – ВРПК, 5000 – ПВ); 0,91 – коэффициент гидролиза;  $m$  – масса навески сырья, г;  $E$  – коэффициент пересчета на моносахарид (арабиноза – 67);  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Влажность сырья и полисахаридов определяли на анализаторе влажности ML-50 (AND, Япония), температура высушивания равна 105 °С, порог срабатывания 0,1 %, навеска 3,0 г. Результаты определений на анализаторе влажности сопоставимы с результатами определения по методике ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Определение сорбционной активности проводили по методике В. И. Решетникова [19]. Около 0,2 г полисахаридов (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл 0,15%-го раствора метиленового синего (CAS № 61–73–4, АО «ВЕК-ТОН», Россия), и перемешивали на лабораторном шейкере с числом колебаний 140 в минуту в течение 1 часа. Отделение равновесного раствора после сорбции проводили путем центрифугирования при 8000 оборотов в минуту. Один миллилитр надосадочной жидкости переносили в мерную колбу объемом 500 мл, и доводили до метки водой очищенной. Далее измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ 2000 при 664 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Расчет показателя сорбционной активности проводили по общепринятой формуле:

$$X = \frac{(A_0 - A) \cdot a \cdot 50}{A_0 \cdot b \cdot (1 - 0,01 \cdot W)},$$

где  $A_0$  – оптическая плотность раствора РСО метиленового синего;  $A$  – оптическая плотность испытуемо-

го раствора;  $a$  – фактическая концентрация раствора РСО метиленового синего мг/мл;  $b$  – навеска вещества в граммах; 50 – объем раствора РСО метиленового синего, мл;  $W$  – влажность вещества в процентах.

Определение молекулярной массы проводили вискозиметрическим методом [20]. Вязкость полимера определяли капиллярным вискозиметром Оствальда. Для расчета молекулярной массы пользовались нелинейным уравнением Марка – Куна – Хувинка, выражающим зависимость характеристической вязкости от молекулярной массы.

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью программы Microsoft Excel. Для сравнения результатов анализа использовали критерий Стьюдента с оценкой достоверности отличий ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование содержания полисахаридов в шишках сосны обыкновенной в разное время года. Для исследования были заготовлены образцы шишек сосны обыкновенной в середине лета, осени и зимы. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Определение содержания ВРПК в шишках сосны обыкновенной**

**Table 1. Determination of the content of WSPC in the cones of scots pine**

№	Месяц заготовки Month of preparation	Влажность, % Humidity, %	Содержание ВРПК, % Content WSPC, %
1	Июль July	8,1	0,46 ± 0,01
2	Октябрь October	8,0	2,17 ± 0,09
3	Январь January	8,6	3,24 ± 0,31

Наибольшее содержание ВРПК в шишках сосны обыкновенной приходится на зимний период, а наименьшее содержание – на летний. Наблюдается постепенное увеличение содержания ВРПК в шишках сосны обыкновенной от летних месяцев к зимним месяцам.

Сорбционную активность ВРПК в зависимости от сезона заготовки оценивали по способности поглощать метиленовый синий *in vitro*. Метиленовый синий является маркером для большинства медицинских сорбентов (угли активированные, лигнины, углерод – минеральные сорбенты и др.) при концентрации 0,15 % в 50 мл на 0,2 г сорбента [4]. Имитирует класс токсинов с средней молекулярной массой до 500 а.е.м (креатин, мочева кислота, барбитураты и др.), так как проникает в поры разного размера и достаточно полно характеризует объем адсорбционного пространства. В качестве препаратов сравнения использовали уголь активированный и кремния диоксид коллоидный («Полисорб МП»). Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Сорбционная активность ВРПК в шишках сосны обыкновенной в летне-осенний период**

**Table 2. Sorption activity of WSPC in cones of scots pine in the summer-autumn period**

№	Месяц заготовки Month of preparation	Влажность, % Humidity, %	Сорбционная активность, мг/г Sorption activity, mg/g
1	Июль July	11,3	194,54 ± 9,27
2	Август August	9,8	219,78 ± 0,48
3	Сентябрь September	11,2	218,00 ± 9,92
4	Октябрь October	11,3	230,69 ± 4,18
5	Ноябрь November	11,1	243,30 ± 9,43*
6	Декабрь December	7,8	220,87 ± 7,57
7	Январь January	8,6	217,26 ± 8,73
8	Февраль February	11,3	210,12 ± 1,72
9	Март March	11,2	220,17 ± 0,46
Препарат сравнения Comparison drug			
10	Уголь активированный Absorbent carbon	5,4	230,9 ± 1,12
11	«Полисорб МП» "Polisorb MP"	5,2	211,5 ± 1,42

**Примечание.** \* Статистически значимое различие с активностью угля активированного ( $p < 0,05$ ).

**Note.** \* Statistically significant difference with the activity of activated carbon ( $p < 0.05$ ).

По результатам исследования установлено, что наибольшей сорбционной активностью в летне-осенний период обладает ВРПК сосны обыкновенной шишек, собранных в октябре и ноябре. Сорбционная активность ноябрьского образца выше, чем у препаратов сравнения, угля активированного и диоксида кремния коллоидного («Полисорб МП»).

Наибольшей сорбционной активностью в зимний период обладает ВРПК сосны обыкновенной шишек, собранных в декабре и марте. Их сорбционная активность выше, чем у препарата сравнения, диоксида кремния коллоидного («Полисорб МП»), но меньше, чем у угля активированного.

Представляло интерес определить, как изменяется молекулярная масса водорастворимых полисахаридов при заготовке шишек в разное время года. Результаты исследования представлены в таблице 3.

По результатам исследования наблюдается, что средняя молекулярная масса ВРПК, полученного из сосны обыкновенной шишек, заготовленных в разное время года, постепенно возрастает от летних месяцев к зимним.

**Таблица 3. Молекулярная масса водорастворимого полисахаридного комплекса сосны обыкновенной шишек**

**Table 3. Molecular weight of the water-soluble polysaccharide complex of pine cones**

№	Месяц заготовки Month of preparation	Молекулярная масса ВРПК Molecular weight WSPC
1	Июль July	18 023,05
2	Август August	12 116,88
3	Сентябрь September	10 888,55
4	Октябрь October	13 257,23
5	Ноябрь November	14 380,49
6	Декабрь December	19 400,14
7	Январь January	21 598,06
8	Февраль February	19 378,27
9	Март March	20 906,20

Вероятно, что динамика изменения молекулярной массы связана с тем, что происходят структурные изменения, связанные с укрупнением или разветвлением молекулы полисахарида.

При проведении корреляционного анализа при сопоставлении значений сорбционной активности полисахаридов и их молекулярной массы выявлена взаимосвязь между двумя сравниваемыми величинами. Значение коэффициента корреляции Пирсона составило 1, что соответствует весьма высокой тесноте связи между сорбционной активностью полисахарида и его молекулярной массы. Таким образом, различия в сорбционной активности полисахаридов, полученных из шишек сосны обыкновенной, заготовленных в разное время года, связаны с изменением молекулярной массы полисахаридов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью нашей работы являлось исследовать содержание, сорбционную активность и молекулярную массу водорастворимых полисахаридов сосны обыкновенной шишек в разные сезоны года.

Самый высокий выход ВРПК отмечен в зимний период, а наименьший – в летний. Исследована сорбционная активность ВРПК шишек сосны обыкновенной по метиленовому синему *in vitro*. Установлено, что наибольшей сорбционной активностью ВРПК обладает в октябре и ноябре. Сорбционная активность ВРПК превышает активность препаратов сравнения угля активированного и диоксида кремния коллоидного («Полисорб МП»).

Определена средняя молекулярная массы ВРПК шишек сосны обыкновенной. Средняя молекулярная масса ВРПК, полученного в разное время года, находится в пределах от 6 872,27 до 21 598,06. Установлена зависимость сорбционной активности ВРПК сосны обыкновенной шишек от молекулярной массы.

Наибольшее содержание и сорбционная активность ВРПК шишек сосны обыкновенной совпадает с периодом заготовки древесины, что обуславливает практическое применение шишек в качестве источника полисахаридов и эффективного детоксицирующего средства для увеличения эффективности использования лесных ресурсов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Lee A. R., Roh S. S., Lee E. S., Min Y. H. Anti-oxidant and anti-melanogenic activity of the methanol extract of Pine cone. *Asian Journal Beauty Cosmetology*. 2016;(14):301–308. DOI: 10.20402/ajbc.2016.0055.
- Wang L., Li X., Wang H. Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pine cones of *Pinus koraiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;126:385–391. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.145.
- Latos-Brozio M., Masek A., Chrzescijanska E., Podsedek A., Kajszyzak D. Characteristics of the polyphenolic profile and antioxidant activity of cone extracts from conifers determined using electrochemical and spectrophotometric methods. *Antioxidants*. 2021;10(11):1723–1737. DOI: 10.3390/antiox10111723.
- Беленовская Л. М., Лешиовская Е. Е. Растительные ресурсы России: Компонентный состав и биологическая активность растений. СПб.: КМК; 2016. 333 с.
- Lee S., Kim W. B., Park S. H., Kim M., Park J., Hwang D. Y., Lee H. Biological properties of butanol extracts from green pine cone of *Pinus densiflora*. *Food Science and Biotechnology*. 2018;27(5):1485–1492. DOI: 10.1007/s10068-018-0382-5.
- Diao Y., Chen B., Wei L., Wang Z. Polyphenols (S3) isolated from cone scales of *pinus koraiensis* alleviate decreased bone formation in rat under simulated microgravity. *Scientific reports*. 2018;(8):12719–12732. DOI: 10.1038/s41598-018-30992-8.
- Lee S. H., Jang T. W., Choi J. S., Mun J. Y., Park J. H. Inhibitory effects of pine cone (*Pinus densiflora*) on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Journal of Plant Research*. 2019;32(4):275–281. DOI: 10.7732/kjpr.2019.32.4.275.
- Shao S., Yi J., Regenstein J.M., Cheng C., Zhang H., Zhao H., Wang H. Protective effects on 60Co- $\gamma$  radiation damage of pine cone polyphenols from *Pinus koraiensis*-loaded chitosan microspheres *in vivo*. *Molecules*. 2018;23:1392–1406. DOI: 10.3390/molecules23061392.
- Grimaldi R., Swann J. R., Vulevic J., Gibson G. R., Costabile A. Fermentation properties and potential prebiotic activity of Bimuno galacto-oligosaccharide (65 % galacto-oligosaccharide content) on *in vitro* gut microbiota parameters. *British Journal of Nutrition*. 2016;(116):480–486. DOI: 10.1017/S0007114516002269.
- Zhan Y., An X., Wang S., Sun M., Zhou H. Basil polysaccharides: A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2020;28(1):115179. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115179.
- Chu L., Yang L., Lin L., Wei J., Wang N., Xu M., Qiao G., Zheng G. Chemical composition, antioxidant activities of polysaccharide from Pine needle (*Pinus massoniana*) and hypolipidemic effect in high-fat diet-induced mice // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125(15):445–452. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.082.

- Zhao Q., Qin J., Wang H., Wang J., Zhang X. Effects of different extraction methods on the properties of pine cone polysaccharides from *Pinus koraiensis*. *BioResources*. 2019;14(4):9945–9956.
- Hwang J., Yadav D., Lee P. C., Jin J. O. Immunomodulatory effects of polysaccharides from marine algae for treating cancer, infectious disease, and inflammation. 2022;36(2):761–777. DOI: 10.1002/ptr.7348.
- Гуляев Д. К., Суменкова А. М., Белоногова В. Д., Рудакова И. П., Курицын А. В. Сорбционная активность полисахаридов древесной зелени и шишек сосны обыкновенной. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2020;19(3): 208–213. DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.29.
- Xu R. B., Yang X., Wang J., Zhao H. T., Lu W. H., Cui J., Cheng C. L., Zou P., Huang W. W., Wang P., Li W. J., Hu X. L. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;(13):14262–14277. DOI: 10.3390/ijms131114262.
- Кондратенко В. В., Кондратенко Т. Ю. О влиянии молекулярной массы на проявление сорбционных свойств пектиновыми веществами. *Новые технологии*. 2011;(2):20–26.
- Bailey R. W., Haq S., Hassid W. Z. Carbohydrate composition of particulate preparations from mung bean (*Phaseolus aureus*) shoots. *Phytochemistry*. 1967;6(2):293–301.
- Оленников Д. Н., Танхаева Л. М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов. *Химия растительного сырья*. 2006;(4): 29–33.
- Решетников В. И. Принципы разработки лекарственных форм сорбентов. Пермь: ГОУ ВПО ПГФА Росздрава; 2008. 196 с.
- Карибова Т. Г., Аджиакметова С. Л., Мыкоц Л. П., Оганесян Э. Т. Некоторые физико-химические характеристики полисахаридов ягод крыжовника отклоненного *Grossularia reclinata* (L.) MILL. *Фармация и фармакология*. 2015;3(3):49–52. DOI: 10.19163/2307-9266-2015-3-3(10)-49-52.
- rospheres in vivo. *Molecules*. 2018;23:1392–1406. DOI: 10.3390/molecules23061392.
- Grimaldi R., Swann J. R., Vulevic J., Gibson G. R., Costabile A. Fermentation properties and potential prebiotic activity of Bimuno galacto-oligosaccharide (65 % galacto-oligosaccharide content) on in vitro gut microbiota parameters. *British Journal of Nutrition*. 2016;(116):480–486. DOI: 10.1017/S0007114516002269.
- Zhan Y., An X., Wang S., Sun M., Zhou H. Basil polysaccharides: A review on extraction, bioactivities and pharmacological applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2020;28(1):115179. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115179.
- Chu L., Yang L., Lin L., Wei J., Wang N., Xu M., Qiao G., Zheng G. Chemical composition, antioxidant activities of polysaccharide from Pine needle (*Pinus massoniana*) and hypolipidemic effect in high-fat diet-induced mice // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125(15):445–452. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.082.
- Zhao Q., Qin J., Wang H., Wang J., Zhang X. Effects of different extraction methods on the properties of pine cone polysaccharides from *Pinus koraiensis*. *BioResources*. 2019;14(4):9945–9956.
- Hwang J., Yadav D., Lee P. C., Jin J. O. Immunomodulatory effects of polysaccharides from marine algae for treating cancer, infectious disease, and inflammation. 2022;36(2):761–777. DOI: 10.1002/ptr.7348.
- Gulyaev D. K., Sumenkova A. M., Belonogova V. D., Rudakova I. P., Kuritsyn A. V. Sorption activity of polysaccharides of woody greens and pine cones. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*. 2020;19(3):208–213. (In Russ.) DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.29.
- Xu R. B., Yang X., Wang J., Zhao H. T., Lu W. H., Cui J., Cheng C. L., Zou P., Huang W. W., Wang P., Li W. J., Hu X. L. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;(13):14262–14277. DOI: 10.3390/ijms131114262.
- Kondratenko V. V., Kondratenko T. Y. On the influence of molecular weight on the manifestation of sorption properties of pectin substances. *New technologies*. 2011;(2):20–26. (In Russ.)
- Bailey R. W., Haq S., Hassid W. Z. Carbohydrate composition of particulate preparations from mung bean (*Phaseolus aureus*) shoots. *Phytochemistry*. 1967;6(2):293–301.
- Olennikov D. N., Tankhaeva L. M. Method of quantitative determination of the group composition of the carbohydrate complex of plant objects. *Chemistry of plant raw materials*. 2006;(4):29–33. (In Russ.)
- Reshetnikov V. I. Principles of development of medicinal forms of sorbents. Perm: GOU VPO PGFA Roszdrava; 2008. 196 p. (In Russ.)
- Karepova T. G., Adjiakhmetova S. L., Mykots L. P., Oganessian E. T. Some physico-chemical characteristics of polysaccharides of gooseberry berries rejected *Grossularia reclinata* (L.) MILL. *Pharmacy and pharmacology*. 2015;3(3):49–52. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2015-3-3(10)-49-52.

## REFERENCES

- Lee A. R., Roh S. S., Lee E. S., Min Y. H. Anti-oxidant and anti-melanogenic activity of the methanol extract of Pine cone. *Asian Journal Beauty Cosmetology*. 2016;(14):301–308. DOI: 10.20402/ajbc.2016.0055.
- Wang L., Li X., Wang H. Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pine cones of *Pinus Koraiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;126:385–391. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.145.
- Latos-Brozio M., Masek A., Chrzciesjanska E., Podsedek A., Kajszyzak D. Characteristics of the polyphenolic profile and antioxidant activity of cone extracts from conifers determined using electrochemical and spectrophotometric methods. *Antioxidants*. 2021;10(11):1723–1737. DOI: 10.3390/antiox10111723.
- Belenovskaya L. M., Lesiovskaya E. E. Plant resources of Russia: Component composition and biological activity of plants. St. Petersburg: KMK; 2016. 333 p. (In Russ.)
- Lee S., Kim W. B., Park S. H., Kim M., Kim D., Park J., Hwang D. Y., Lee H. Biological properties of butanol extracts from green pine cone of *Pinus densiflora*. *Food Science and Biotechnology*. 2018;27(5):1485–1492. DOI: 10.1007/s10068-018-0382-5.
- Diao Y., Chen B., Wei L., Wang Z. Polyphenols (S3) isolated from cone scales of *Pinus koraiensis* alleviate decreased bone formation in rat under simulated microgravity. *Scientific reports*. 2018;(8):12719–12732. DOI: 10.1038/s41598-018-30992-8.
- Lee S. H., Jang T. W., Choi J. S., Mun J. Y., Park J. H. Inhibitory effects of pine cone (*Pinus densiflora*) on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Journal of Plant Research*. 2019;32(4):275–281. DOI: 10.7732/kjpr.2019.32.4.275.
- Shao S., Yi J., Regenstein J. M., Cheng C., Zhang H., Zhao H., Wang H. Protective effects on <sup>60</sup>Co-γ radiation damage of pine cone polyphenols from *Pinus koraiensis*-loaded chitosan mic-

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-85-90](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-85-90)  
УДК 615.32



Оригинальная статья / Research article

## Разработка параметров стандартизации травы культивируемого вида манжетка мягкая (*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.)

В. Д. Бояршинов✉, Е. В. Зорина

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

✉ Контактное лицо: Бояршинов Виталий Дмитриевич. E-mail: [vitaly.boyarshinov@yandex.ru](mailto:vitaly.boyarshinov@yandex.ru)

ORCID: В. Д. Бояршинов – <https://orcid.org/0000-0002-8605-0847>; Е. В. Зорина – <https://orcid.org/0000-0002-7401-8196>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 09.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Для внедрения в фармацевтическую практику предлагается трава манжетки с целью получения экстрактов, обладающих различными видами фармакологической активности. Для расширения сырьевой базы манжеток предложено использовать культивируемое растение с высокой биомассой – манжетку мягкую (*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.). Трава манжетки мягкой по качественным и количественным характеристикам химического состава сопоставима с образцами сырья дикорастущих манжеток. Наличие хемотаксономических особенностей обуславливает необходимость подготовки нормативной документации для внедрения данного растения в качестве источника лекарственного сырья.

**Цель.** Цель исследования разработка методики оценки основной группы БАВ и количественного определения флавоноидов в траве манжетки мягкой.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали образцы травы манжетки мягкой, заготовленной от культивируемых на территории Пермского края растений. Хроматографические параметры подлинности сырья определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для разработки параметров количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки мягкой осуществляли модификацию методики предложенной для травы манжетки.

**Результаты и обсуждение.** При проведении хроматографического исследования в траве манжетки мягкой идентифицированы цинарозид, рутин, кверцетин. К маркерным веществам травы манжетки мягкой отнесён цинарозид. В качестве оптимальной хроматографической системы выбрана этилацетат:уксусная кислота (85:15). Проведена модификация и валидация методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки. Обоснована смена экстрагента, размера частиц, времени и кратности экстракции для проведения пробоподготовки и использование цинарозида в качестве стандартного вещества. Установлены оптимальные условия реакции комплексообразования с алюминия хлоридом.

**Заключение.** Для определения подлинности травы манжетки мягкой предложено использовать идентификацию цинарозида методом ТСХ. Модифицированная методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на цинарозид для травы манжетки мягкой, воспроизводима, правильна и может быть использована для стандартизации. При апробации методики на образцах сырья, заготовленных в Пермском крае, установлен диапазон значений содержания флавоноидов 3,14–4,84 %, со средним уровнем варибельности.

**Ключевые слова:** манжетка мягкая, *Alchemilla mollis*, тонкослойная хроматография (ТСХ), спектрофотометрия, флавоноиды, цинарозид

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

**Вклад авторов.** Авторы провели планирование исследования, сбор данных, анализ литературы, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка рукописи осуществлено авторами в равной степени.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Бояршинов В. Д., Зорина Е. В. Разработка параметров стандартизации травы культивируемого вида манжетка мягкая (*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):85–90. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-85-90](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-85-90)

## Development of Quality Control Parameters for Standardization of Herb of the Cultivated Plant *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.

Vitaly D. Boyarshinov✉, Elena V. Zorina

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

✉ Corresponding author: Vitaly D. Boyarshinov. E-mail: [vitaly.boyarshinov@yandex.ru](mailto:vitaly.boyarshinov@yandex.ru)

ORCID: Vitaly D. Boyarshinov – <https://orcid.org/0000-0002-8605-0847>; Elena V. Zorina – <https://orcid.org/0000-0002-7401-8196>.

Received: 14.10.2022

Revised: 09.12.2022

Published: 27.12.2022

© Бояршинов В. Д., Зорина Е. В., 2022

© Boyarshinov V. D., Zorina E. V., 2022

## Abstract

**Introduction.** *Alchemilla* herb is proposed for introduction into pharmaceutical practice, for obtaining extracts with various pharmacological activity. To expand, resource base of *Alchemilla* it has been proposed to use a high biomass cultivated plant – *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. In terms of qualitative and quantitative characteristics of the chemical composition *Alchemilla mollis* herb is comparable to the samples of raw materials of wild-growing *Alchemilla*. The presence of chemotaxonomic features necessitates the preparation of regulatory documentation for the introduction of this plant as a source of medicinal raw materials.

**Aim.** Development of a methodology for assessing the main group of biologically active substances and the quantitative determination of flavonoids in *Alchemilla mollis* herb.

**Materials and methods.** As objects of study, we used *Alchemilla mollis* herb harvested from plants cultivated in the Perm Krai. The chromatographic parameters of raw material authenticity were determined by thin layer chromatography (TLC). To develop the parameters for the quantitative determination of flavonoids in *Alchemilla mollis* herb, a modification of the method proposed for *Alchemilla* herb was carried out.

**Results and discussion.** During chromatographic study of *Alchemilla mollis* herb were identified cinaroside, rutin, and quercetin. Cynaroside was referred to the marker substances. Ethyl acetate:acetic acid (85:15) was chosen as the optimal chromatographic system. A modification and validation of the method for the quantitative determination of flavonoids in *Alchemilla* herb was carried out. The change of the extractant, particle size, time and frequency of extraction for sample preparation and the optimal use of cynaroside as a standard substance are substantiated. The optimal conditions for the reaction of complex formation with aluminum chloride are established.

**Conclusion.** To determine the authenticity of *Alchemilla mollis* herb, it was proposed to use the identification of cynaroside by TLC. The modified method for the quantitative determination of flavonoids in terms of cynaroside for the *Alchemilla mollis* herb, reproducible, correct and can be used for standardization. When testing the methodology on samples of raw materials harvested in the Perm region, a range of values for the content of flavonoids was 3.14–4.84 %, with an average level of variability.

**Keywords:** *Alchemilla mollis*, thin layer chromatography (TLC), spectrophotometry, flavonoids, cynaroside

**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.** The authors carried out the planning of the study, data collection, literature analysis, analysis and interpretation of the obtained data, preparation of the manuscript were carried out by the authors equally.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Boyarshinov V. D., Zorina E. V. Development of quality control parameters for standardization of herb of the cultivated plant *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):85–90. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-85-90](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-85-90)

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для внедрения в фармацевтическую практику предлагается трава манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L. s. l) сем Розоцветные (*Rosaceae*). Водные экстракты, получаемые из данного вида сырья, проявляют гипогликемическую и гиполипидемическую [1], иммуномодулирующую [2], нейрорепротекторную [3] активности. Для спиртовых экстрактов травы манжетки выявлены противомикробный [4, 5] и гемореологический [6], гепатопротекторный [7], дерматопротективный [8, 9] эффекты. Согласно данным литературы преобладающими группами биологически активных веществ (БАВ) в траве манжетки являются флавоноиды производные лютеолина и кверцетина [10, 11].

Стандартизацию травы манжетки предлагают проводить по содержанию различных групп БАВ. В качестве химических маркеров для стандартизации (идентификации) сырья предложены рутин, гиперозид, галловая и кофейная кислоты, агримониин, пролин, оксилезин [6]. Для количественного анализа предложены методики определения флавоноидов

дифференциальной спектрофотометрией с использованием в качестве стандартного образца рутина [12], цинарозида [13], кверцетина [14]. В работе Ж. С. Лесовой с соавторами [15] предложена методика оценки содержания флавоноидов как суммы 7-О-гликозидов в пересчете на лютеолин-7-гликозид и 3-О-гликозидов в пересчете на кверцетин. В Европейской фармакопее нормируется содержание дубильных веществ в пересчете на пирогаллол, которые определяют в реакции с фосфорно-вольфрамовым реактивом.

Для расширения сырьевой базы манжеток предложено использовать культивируемое растение с высокой биомассой – манжетку мягкую (*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.) [16]. Трава, полученная от данного микровида, по качественным и количественным характеристикам химического состава сопоставима с образцами сырья дикорастущих манжеток, при наличии хемотаксономической особенности в большем накоплении дубильных веществ [17].

Для дальнейшего внедрения данного растения в качестве источника сырья для получения лекарственных средств необходима подготовка нормативной документации, в которой определены требования к

подлинности, качеству и содержанию действующих веществ.

**Цель исследования** разработка методики оценки основной группы БАВ и количественного определения флавоноидов в траве манжетки мягкой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали образцы травы манжетки мягкой, заготовленной от культивируемых на территории Пермского края растений (участок 1 – Пермский район, 7 км от п. Кукуштан; участок 2 – г. Пермь, питомник ФГБОУ ВО Пермский ГАТУ, участок 3 – Пермский район, д. Кулики) в период 2021 по 2022 года. Растительное сырье собирали в период массового цветения, высушивали воздушно-теневым способом согласно правилам заготовки травы манжетки обыкновенной [12]. Все реактивы и растворители были использованы марки х.ч. и ч.д.а. (АО «ВЕКТОН», Россия). Спектрофотометрические определения проводили на приборе СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Хроматографические параметры подлинности сырья определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Разделение проводили на пластинках Sorbfil (ПТСХ-П-А) (ООО «ИМИД», Россия). Для выбора оптимальной хроматографической системы были апробированы следующие: муравьиная кислота:вода:этилацетат (8:8:84), этилацетат:уксусная кислота (85:15), бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:2). Детектирование проводили путем оценки хроматограмм в видимом и УФ-свете (254 нм и 365 нм) до и после обработки 2%-м раствором алюминия хлорида. В качестве стандартов использовали аутентичные образцы рутина, кверцетина, цинарозида, лютеолина (содержание 98,0 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия, 80212) в виде 0,05%-х спиртовых растворов.

Для разработки параметров количественного содержания флавоноидов в траве манжетки мягкой осуществляли модификацию методики предложенной для травы манжетки [12], использовали стандартный раствор цинарозида 0,05 %.

Валидацию методик осуществляли согласно ОФС.1.1.0012.15. Влажность определяли в соответствии с ОФС.1.5.3.0007.15. Статистическую обработку осуществляли в соответствии с ОФС.1.1.0013.15.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения параметров подлинности сырья проведено ТСХ исследование в трех хроматографических системах со значениями полярности (P) 4,97–6,02, выбранных в соответствии с алгоритмом, предложенным в работе [18]. Во всех апробируемых хроматографических системах в водных и спиртовых извлечениях травы манжетки мягкой идентифицирован цинарозид. В исследуемых извлечениях травы манжетки мягкой рутин идентифицировали в системе этилацетат:уксусная кислота (85:15). В спиртовых

извлечениях при использовании систем муравьиная кислота:вода:этилацетат (8:8:84) и этилацетат:уксусная кислота (85:15) идентифицирован кверцетин. На основании полученных данных к веществу маркеру травы манжетки мягкой отнесен цинарозид. В качестве хроматографической системы целесообразно использовать этилацетат:уксусная кислота (85:15), так как в данной системе происходит наилучшее разделение гликозидных форм флавоноидов травы манжетки мягкой, что обеспечивает специфичность определения цинарозида. Дополнительными преимуществами данной системы является двухкомпонентность и наименьшее время хроматографирования.

Для извлечения флавоноидов травы манжетки мягкой возможно использование в качестве экстрагента воду очищенную или спирт этиловый 95 %.

**Методика определения основных групп БАВ в траве манжетки мягкой.** На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 5 мкл раствора СО цинарозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат:уксусная кислота (85:15) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронтом растворителей не менее 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывают алюминия хлорида спиртовым раствором 2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 3–5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме раствора СО цинарозида должна обнаруживаться зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: одна зона адсорбции с флуоресценцией желтого или коричневого цвета на уровне зоны СО цинарозида; две зоны адсорбции с флуоресценцией желтого или желто-коричневого цвета ниже зоны цинарозида, зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета выше зоны цинарозида; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Как уже было отмечено, преобладающей группой фенольных соединений в сырье являются флавоноиды, для количественного определения которых предлагается использовать методику дифференциальной спектрофотометрии.

В результате изучения УФ-спектров поглощения водных и спиртовых извлечений из травы манжетки мягкой установлено, что в области характерной для поглощения флавоноидов отсутствуют выраженные максимумы, вследствие чего использование прямой спектрофотометрии для оценки качества сырья не представляется возможным. При реакции извлечений с алюминия хлоридом наблюдали четко выражен

ный максимум, который зависел от вида экстрагента и его концентрации.

Согласно литературным данным [10, 11] и результатам качественного анализа в траве манжетки мягкой сумма флавоноидов представлена гликозидами и агликонами. Вследствие различной растворимости форм флавоноидов в воде и органических растворителях, проведено исследование по выбору экстрагента, который максимально полно извлекает бы сумму этих соединений. Извлечение флавоноидов осуществляли водой очищенной, спиртом этиловым в концентрации 50, 70, 80 и 95 %, результаты определения оптической плотности представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Результаты спектрофотометрии извлечений травы манжетки мягкой

**Table 1.** The results of spectrophotometry of extracts of *Alchemilla mollis* herb

Экстрагент Extracting agent	Среднее значение Mean	
	Максимум поглощения (λ), нм Absorption maximum (λ), nm	Оптической плотности (A) Absorbance (A)
Вода Water	398 ± 1	0,43 ± 0,01
Спирт этиловый 50 % Ethyl alcohol 50 %	398 ± 0	0,32 ± 0,02 <sup>*1</sup>
Спирт этиловый 70 % Ethyl alcohol 70 %	398 ± 0	0,37 ± 0,01 <sup>*1,2</sup>
Спирт этиловый 80 % Ethyl alcohol 80 %	403 ± 3	0,25 ± 0,07 <sup>*1,3</sup>
Спирт этиловый 95 % Ethyl alcohol 95 %	399 ± 7	0,11 ± 0,02 <sup>*1,2,3,4</sup>

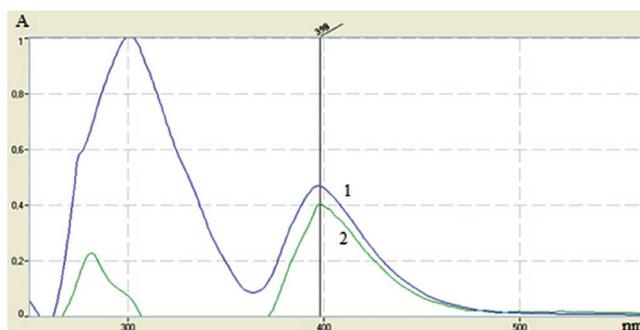
**Примечание.** <sup>\*1</sup>  $p < 0,05$  в сравнении со значениями извлечения, экстрагент вода; <sup>\*2</sup>  $p < 0,05$  в сравнении со значениями извлечения, экстрагент спирт этиловый 50 %; <sup>\*3</sup>  $p < 0,05$  в сравнении со значениями извлечения, экстрагент спирт этиловый 70 %; <sup>\*4</sup>  $p < 0,05$  в сравнении со значениями извлечения, экстрагент спирт этиловый 80 %.

**Note.** <sup>\*1</sup>  $p < 0,05$  compared to recovery values, extractant water; <sup>\*2</sup>  $p < 0,05$  compared to recovery values, extractant ethyl alcohol 50 %; <sup>\*3</sup>  $p < 0,05$  compared to recovery values, extractant ethyl alcohol 70 %; <sup>\*4</sup>  $p < 0,05$  compared to recovery values, extractant ethyl alcohol 80 %.

Преимущество экстрагента определяли по наибольшему значению оптической плотности в максимуме поглощения. Водные извлечения показали наибольшие значения оптической плотности и стабильный максимум поглощения.

Дифференциальный спектр комплекса флавоноидов водного извлечения с алюминия хлоридом характеризовался четко выраженным максимумом при длине волны 398 ± 1 нм. Дифференциальные кривые комплексов флавоноидов и СО цинарозида с алюминия хлоридом совпадали по конфигурации и максимуму поглощения (рисунок 1).

Следует отметить, что трава манжетки мягкой густо опушена и при сильном измельчении фрагменты листовых пластинок комковались за счет смыкания волосков. Вследствие чего требовались дополнительные исследования по выбору размера частиц



**Рисунок 1.** Спектры поглощения комплексов флавоноидов с алюминия хлорида:

1 – водного извлечения травы манжетки мягкой; 2 – цинарозида

**Figure 1.** Absorption spectra of flavonoid complexes with aluminum chloride

1 – aqueous extract of *Alchemilla mollis* herb; 2 – cynaroside

для максимального извлечения флавоноидов. Установлено, что при измельчении сырья до размера частиц от 0,5 до 1,0 мм средняя оптическая плотность составляет 0,4407 ± 0,0118, при размере частиц от 1,0 до 2,0 мм средняя оптическая плотность составляет 0,5387 ± 0,0025. По-видимому, «комки» сырья плохо смачиваются экстрагентом, что приводит к меньшему выходу флавоноидов.

Результаты модификации методики по параметрам размер частиц и экстрагент свидетельствуют о необходимости определения оптимальных параметров экстракции. Извлечения, полученные при однократной экстракции в течение одного часа (0,43 ± 0,01), при двукратной экстракции по 45 минут (0,38 ± 0,06) и при трехкратной экстракции по 30 минут (0,43 ± 0,02), не имели статистически значимых различий в оптической плотности. В целях сокращения затрат при использовании методики, считаем рациональным однократное извлечение в течение одного часа.

При определении условий протекания реакции комплексообразования с алюминия хлоридом наибольшие значения оптической плотности наблюдали при соотношении объемов извлечения и реактива 1:2, что определяет его оптимальность. При сравнении оптических плотностей продуктов реакций, протекающих в воде (0,6044 ± 0,0080) и 95%-м этаноле (0,4041 ± 0,0093,  $p < 0,05$ ) установлено, оптимальным растворителем является вода. Стабильность оптической плотности наступала через 30 минут с момента получения комплекса и сохранялась в течение 2 часов.

Валидацию методики проводили по показателям специфичность, линейность, правильность, прецизионность. Селективность методики обусловлена тем, что реакция комплексообразования с алюминия хлоридом является специфичной для флавоноидов за счет батохромного сдвига спектра продукта реакции, позволяющего отделить их от группы сопутствующих веществ фенольной природы. Использование в ка-

честве раствора сравнения извлечение без реактива при измерении оптической плотности исключает влияние окрашенных, а также других соединений, содержащихся в растительном сырье.

Линейная зависимость между величинами оптической плотности и содержанием флавоноидов в извлечениях из травы манжетки описывается уравнением:

$$Y = 2,2 \times X + 0,2; r = 0,998 (p = 0,00012),$$

что свидетельствует о соблюдении линейной зависимости в интервале 50–150 % от номинального значения определяемой величины.

Оценку правильности осуществляли методом модельных смесей. Для уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными и расчетными величинами тангенс угла наклона прямой равнялся единице, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Метрологические характеристики представлены в таблице 2, ошибка единичного определения составила 2,38 %.

**Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки мягкой**

**Table 2. Metrological characteristics of the method of quantitative determination of flavonoids in *Alchemilla mollis* herb**

n	f	$\bar{x}$	S <sup>2</sup>	S	P, %	t <sub>p,n</sub>	Δx	ε, %
6	5	2,52	0,00319	0,05648	95	2,57	0,06	2,38

При определении внутрилабораторной прецизионности в семи повторностях, величина относительного стандартного отклонения RSD = 2,21 %. Полученные результаты подтверждают прецизионность методики.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве манжетки мягкой. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья (размер частиц мене 2 мм) помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды очищенной и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 минут. Горячее извлечение фильтровали через бумажный складчатый фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. После охлаждения объем извлечения доводили до метки растворителем. Реакцию комплексообразования осуществляли следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1 мл полученного извлечения, прибавляли 2 мл 2%-го раствора алюминия хлорида в 95%-м этиловом спирте, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводили объем раствора до метки водой очищенной. Через 40 минут измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре. Для получения раствора сравнения: 1 мл извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводили объем раствора водой, очищенной до метки.

Апробация методики количественного определения флавоноидов проведена на образцах травы манжетки мягкой, культивируемой на опытных участках в Пермском крае (таблица 3).

**Таблица 3. Содержание флавоноидов в траве манжетки мягкой**

**Table 3. The content of flavonoids in *Alchemilla mollis* herb**

Место и период заготовки Place and period of harvesting	Содержание флавоноидов, % Flavonoid content, %
Участок 1, 2021 г. Field 1, 2021 year	4,10 ± 0,09
Участок 2, 2021 г. Field 2, 2021 year	4,84 ± 0,06
Участок 3, 2021 г. Field 3, 2021 year	4,55 ± 0,08
Участок 1, 2022 г. Field 1, 2022 year	4,50 ± 0,06
Участок 2, 2022 г. Field 2, 2022 year	3,14 ± 0,06

Сумма флавоноидов для исследуемых образцов варьирует от 3,14 до 4,84 % (в пересчете на цинарозид). Содержание флавоноидов в культуре манжетки мягкой характеризуется средней вариабельностью (коэффициент вариации 14 %), в отличие от дикорастущих видов [12].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения подлинности травы манжетки мягкой предложено использовать идентификацию цинарозида в качестве маркерного вещества методом ТСХ. Модифицированная методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид для травы манжетки мягкой, воспроизводима, правильна и может быть использована для стандартизации. При апробации методики на образцах сырья, заготовленных в Пермском крае, установлен диапазон значений содержания флавоноидов 3,14–4,84 %.

## ЛИТЕРАТУРА

- Юшкова Т. А., Зорина Е. В., Белоногова В. Д. Оценка антидиабетической активности экстракта травы *Alchemilla vulgaris*. *Дневник казанской медицинской школы*. 2017;III(XVII):49–53.
- Юшков В. В., Зорина Е. В., Юшкова Т. А. Оценка иммуностропной активности настоя травы манжетки. *Российский иммунологический журнал*. 2014;8(17)3:755–757.
- Шилова И. В., Суслов Н. И., Самылина И. А., Баева В. М., Лазарева Н. Б., Мазин Е. В. Нейропротекторные свойства настоя манжетки обыкновенной. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(11):37–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-37-41.
- Мазуркова Н. А., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):9–15. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15
- Boroja T., Mihailović V., Katanić J., Pan S. P., Nikles S., Imbimbo P., Monti D. M., Stanković N., Stanković M. S., Bauer R. The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulga-*

- ris L. *South African Journal of Botany*. 2018;116:175–184. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.03.007
- Лобанова И. Е., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А., Кукушкина Т. А., Филиппова Е. И. Виды рода *Alchemilla* L. (Rosaceae): химический состав, биологическая активность, использование в медицине (обзор). *Химия растительного сырья*. 2019;1:5–22. DOI: 10.14258/jcprpm.2019014032.
  - Jurić T., Katanić Stanković J. S., Rosic G., Selakovic D., Joksimović J., Mišić D., Stanković V. D., Mihailović V. Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats. *South African Journal of Botany*. 2020;128:141–151. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.09.010.
  - Hwang E., Ngo H., Seo S. A., Park B., Zhang M., Yi T. H. Protective effect of dietary *Alchemilla mollis* on UVB-irradiated premature skin aging through regulation of transcription factor NFATc1 and Nrf2/ARE pathways. *Phytomedicine*. 2018;39:125–136. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.12.025.
  - Tasić-Kostov M., Arsić I., Pavlović D., Stojanović S., Najman S., Naumović S., Tadić V. Towards a modern approach to traditional use: in vitro and in vivo evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. *Journal of ethnopharmacology*. 2019;238:111789. DOI: 10.1016/j.jep.2019.03.016.
  - Dos Santos Szewczyk K., Pietrzak W., Klimek K., Grzywa-Celińska A., Celiński R., Gogacz M. LC-ESI-MS/MS Identification of Biologically Active Phenolics in Different Extracts of *Alchemilla acutiloba* Opiz. *Molecules*. 2022;27(3):621. DOI: 10.3390/molecules27030621.
  - Mandrone M., Coqueiro A., Poli F., Antognoni F., Choi Y. H. Identification of a Collagenase-Inhibiting Flavonoid from *Alchemilla vulgaris* Using NMR-Based Metabolomics. *Planta medica*. 2018;84(12–13):941–946. DOI: 10.1055/a-0630-2079.
  - Зорина Е. В. Фармакогностическое изучение видов рода *Alchemilla* L. Пермского края. Дис. ... канд. фарм. наук. Пермь. 2009. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-vidov-roda-alchemilla-l-permskogo-kraja> Ссылка активна на 14.09.2022.
  - Андреева В. Ю., Калинкина Г. И. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. S. L. *Химия растительного сырья*. 2000;1:85–88.
  - Stanilova M., Gorgorov R., Trendafilova A., Nikolova M., Vitkova A. Influence of nutrient medium composition on in vitro growth, polyphenolic content and antioxidant activity of *Alchemilla mollis*. *Natural Product Communications*. 2012;7:1–6.
  - Лесовая Ж. С., Писарев Д. И., Новиков О. О., Романова Т. А. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. S. L. *Актуальные проблемы медицины*. 2010;22(93):145–149.
  - Зорина Е. В., Бояршинов В. Д. Первичная интродукция манжетки мягкой *Alchemilla mollis*. *Вестник ПГФА*. 2018;22:143–144.
  - Бояршинов В. Д., Зорина Е. В. Сравнительный анализ химического состава травы культивируемого вида манжетка мягкая (*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.) и дикорастущего манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.s.l.). *Химия растительного сырья*. 2022;1:115–122. DOI: 10.14258/jcprpm.20220110291.
  - Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):69–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
  - Shilova I. V., Suslov N. I., Mazin E. V., Samylyna I. A., Baeva V. M., Lazareva N. B. Neuroprotective properties of common lady's mantle infusion. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;53(11):1059–1062. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-37-41.
  - Mazurkova N. A., Protsenko M. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Lobanova I. E., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Agafonov A. P. Investigation of the Antiviral Activity of Experimental Samples Obtained from the Grass and Roots of *Alchemilla vulgaris* L. Against Vaccinia Virus and Ectromelia Virus. *Drug development & registration*. 2019;8(4):9–15. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15.
  - Boroja T., Mihailović V., Katanić J., Pan S. P., Nikles S., Imbimbo P., Monti D. M., Stanković N., Stanković M. S., Bauer R. The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L. *South African Journal of Botany*. 2018;116:175–184. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.03.007
  - Lobanova I. E., Vysochina G. I., Mazurkova N. A., Kukushkina T. A., Filippova T. I. Species of the genus *Alchemilla* L. (Rosaceae): chemical composition, biological activity and use in medicine (review). *Chemistry of plant raw material*. 2019;1:15–22. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprpm.2019014032.
  - Jurić T., Katanić Stanković J. S., Rosic G., Selakovic D., Joksimović J., Mišić D., Stanković V. D., Mihailović V. Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats. *South African Journal of Botany*. 2020;128:141–151. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.09.010.
  - Hwang E., Ngo H., Seo S. A., Park B., Zhang M., Yi T. H. Protective effect of dietary *Alchemilla mollis* on UVB-irradiated premature skin aging through regulation of transcription factor NFATc1 and Nrf2/ARE pathways. *Phytomedicine*. 2018;39:125–136. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.12.025.
  - Tasić-Kostov M., Arsić I., Pavlović D., Stojanović S., Najman S., Naumović S., Tadić V. Towards a modern approach to traditional use: in vitro and in vivo evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. *Journal of ethnopharmacology*. 2019;238:111789. DOI: 10.1016/j.jep.2019.03.016.
  - Dos Santos Szewczyk K., Pietrzak W., Klimek K., Grzywa-Celińska A., Celiński R., Gogacz M. LC-ESI-MS/MS Identification of Biologically Active Phenolics in Different Extracts of *Alchemilla acutiloba* Opiz. *Molecules*. 2022;27(3):621. DOI: 10.3390/molecules27030621.
  - Mandrone M., Coqueiro A., Poli F., Antognoni F., Choi Y. H. Identification of a Collagenase-Inhibiting Flavonoid from *Alchemilla vulgaris* Using NMR-Based Metabolomics. *Planta medica*. 2018;84(12–13):941–946. DOI: 10.1055/a-0630-2079.
  - Zorina E. V. Pharmacognostic study of species of the genus *Alchemilla* L. Perm region. [Dissertation]. Perm. 2009. Available at: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-vidov-roda-alchemilla-l-permskogo-kraja> Accessed: 14.09.2022. (In Russ.)
  - Andreyeva V. Yu., Kalinkina G. I. Development of a method for the quantitative determination of flavonoids in *Alchemilla vulgaris* L. S. L. *Chemistry of plant raw material*. 2000;1:85–88. (In Russ.)
  - Stanilova M., Gorgorov R., Trendafilova A., Nikolova M., Vitkova A. Influence of nutrient medium composition on in vitro growth, polyphenolic content and antioxidant activity of *Alchemilla mollis*. *Natural Product Communications*. 2012;7:1–6.
  - Lesovaya Zh. S., Pisarev D. I., Novikov O. O., Romanova T. A. Development of a method for the quantitative determination of flavonoids in the common herb *Alchemilla vulgaris* L. S. L. *Challenges in modern medicine*. 2010;22(93):145–149. (In Russ.)
  - Zorina E. V., Boyarshinov V. D. Primary introduction of *Alchemilla mollis*. *Vestnik PGFA*. 2018;22:143–144. (In Russ.)
  - Boiarshinov V. D., Zorina E. V. Comparative analysis of the chemical composition of herb cultivated *Alchemilla mollis* and wild-growing *Alchemilla vulgaris*. *Chemistry of plant raw material*. 2022;1:115–122. DOI: 10.14258/jcprpm.20220110291. (In Russ.)
  - Trineeva O. V. Development of theoretical approaches to determination of the main groups of biologically active substances of medicinal plant raw materials by TLC method. *Drug development & registration*. 2021;10(2):69–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79. (In Russ.)

## REFERENCES

- Yushkova T. A., Zorina E. V., Belonogova V. D. Evaluation of the antidiabetic activity of the extract of *Alchemilla vulgaris* herb. *Dnevnik kazanskoj meditsinskoj shkoly*. 2017;III(XVII):49–53. (In Russ.)
- Yushkov V. V., Zorina E. V., Yushkova T. A. Evaluation of the immunotropic activity of the infusion of the cuff herb. *Russian journal of immunology*. 2014;8(17)3:755–757. (In Russ.)

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-91-98](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-91-98)  
УДК 615.282:615.076.7



Оригинальная статья / Research article

## Валидационные испытания питательной среды Сабуро при определении противогрибковой активности впервые синтезированных соединений методом двукратных серийных разведений

В. В. Новикова ✉, Н. А. Пулина, В. Г. Лужанин, Е. Р. Курбатов

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

✉ Контактное лицо: Новикова Валентина Васильевна. E-mail: vvnperm@yandex.ru

ORCID: В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Н. А. Пулина – <https://orcid.org/0000-0002-0435-0484>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Е. Р. Курбатов – <https://orcid.org/0000-0001-6426-7976>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 09.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** В связи высокой распространенностью и социальной значимостью грибковых инфекций поиск новых антифунгальных препаратов является актуальным направлением развития современной фармакологии. Одним из важных компонентов доклинических микробиологических исследований, влияющих на конечный результат, являются питательные среды, используемые в процессе научного эксперимента.

**Цель.** Валидировать использование жидкой среды Сабуро как альтернативы среды RPMI 1640 с глутамином для оптимизации экспериментальных условий определения ПГА новых соединений микрометодом серийных разведений.

**Материалы и методы.** Для изучения противогрибковой активности (ПГА) новых молекул использовали микрометод двукратных серийных разведений. Изучали ПГА в отношении типового тест-штамма *Candida albicans* NCTC 885-653. Оценку валидационных параметров осуществляли согласно принципам, изложенным в ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методик». Для апробации валидированной методики использовали новое соединение из группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот.

**Результаты и обсуждение.** Получены результаты, соответствующие критериям приемлемости в отношении изученных валидационных параметров – правильность, прецизионность, линейность, устойчивость, предел количественного обнаружения. Показана возможность использования среды Сабуро для определения противогрибковой активности на примере нового соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот.

**Заключение.** В связи с доказанными лучшими ростовыми свойствами испытуемой альтернативной жидкой среды Сабуро в отношении исследуемой культуры *Candida albicans* и сходимости результатов определения антифунгальной активности при использовании альтернативной и референтной сред, можно рекомендовать жидкую среду Сабуро для использования при определении ПГА впервые синтезированных соединений с использованием микрометода серийных разведений.

**Ключевые слова:** алидация, микрометод серийных разведений, бульон Сабуро, среда RPMI-1640 с глутамином, противогрибковая активность

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

**Вклад авторов.** В. В. Новикова – обоснование актуальности работы, проведение исследований, касающихся валидации микрометода серийных разведений. Н. А. Пулина – получение субстанции нового соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот. В. Г. Лужанин – осуществление организационных работ, подготовка текста статьи. Е. Р. Курбатов – подготовка текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Для цитирования:** Новикова В. В., Пулина Н. А., Лужанин В. Г., Курбатов Е. Р. Валидационные испытания питательной среды Сабуро при определении противогрибковой активности впервые синтезированных соединений методом двукратных серийных разведений. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):91–98. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-91-98](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-91-98)

## Validation Testing of Sabouraud Liquid Medium in Determining the Antifungal Activity of Newly Synthesized compounds by the Method of Two-fold Serial Dilutions

Valentina V. Novikova ✉, Natalia A. Pulina, Vladimir G. Luzhanin, Evgeniy R. Kurbatov

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

✉ Corresponding author: Valentina V. Novikova. E-mail: vvnperm@yandex.ru

ORCID: Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Natalia A. Pulina – <https://orcid.org/0000-0002-0435-0484>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Evgeniy R. Kurbatov – <https://orcid.org/0000-0001-6426-7976>.

Received: 14.10.2022

Revised: 09.12.2022

Published: 27.12.2022

© Новикова В. В., Пулина Н. А., Лужанин В. Г., Курбатов Е. Р., 2022

© Novikova V. V., Pulina N. A., Luzhanin V. G., Kurbatov E. R., 2022

## Abstract

**Introduction.** Due to the high prevalence and social significance of fungal infections, the search for new antifungal drugs is an actual direction of modern pharmacology. One of the important components of preclinical microbiological studies is the culture media used in the process of experiment.

**Aim.** To validate the use Sabouraud liquid medium as an alternative to RPMI 1640 medium to optimize the experimental conditions for the determination of antifungal activity of new compounds by the microserial dilution method

**Materials and methods.** The micromethod of two-fold serial dilutions to study the antifungal activity of new molecules was used. Antifungal activity was studied against the reference test strain *Candida albicans* NCTC 885-653. The evaluation of the validation parameters was carried out according to the principles set forth in the General Pharmacopoeia Monograph.1.1.0021.18 «Validation of microbiological methods». A new compound from the group of 4-(het)aryl-2,4-dioxobutanoic acid amide derivatives was used for test the validated method.

**Results and discussion.** Results were obtained that meet the acceptance criteria for the studied validation parameters – trueness, precision, linearity, robustness and quantitation limit. The possibility of using Sabouraud's medium for the determination of antifungal activity was shown on the example of a new compound of the group of 4-(het)aryl-2,4-dioxobutanoic acid amide derivatives.

**Conclusion.** The tested alternative liquid Sabouraud medium can be recommended for use in determining the antifungal activity of the newly synthesized compounds with the microdilutions method because the proven its better growth properties for the investigated yeast strain and the convergence of the results of determining antifungal activity using alternative and reference media.

**Keywords:** validation, serial dilution micromethod, Sabouraud broth, RPMI-1640 medium with glutamine, antifungal 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.** Valentina V. Novikova – substantiating the relevance of the work, conducting research related to the validation of the serial dilution micromethod. Natalia A. Pulina – obtaining a substance of a new compound of the group of 4- (het) aryl-2,4-dioxobutanoic acid amide derivatives. Vladimir G. Luzhanin – implementation of organizational work, preparation of the text of the article. Evgeniy R. Kurbatov – preparation of the text of the article. All authors participated in the discussion of the results. All authors participated in the discussion of the results.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Novikova V. V., Pulina N. A., Luzhanin V. G., Kurbatov E. R. Validation testing of Sabouraud liquid medium in determining the antifungal activity of newly synthesized compounds by the method of two-fold serial dilutions. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):91–98. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-91-98](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-91-98)

## ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение грибковых инфекций [1–6], возникающих на фоне антибиотикотерапии, иммунодефицитных состояний, нарушения обменных процессов в условиях растущей антимикотикорезистентности обуславливает актуальность поиска новых антифунгальных препаратов [7–12]. Одним из ключевых моментов данных исследований является изучение противогрибковой активности новых молекул в лабораторных условиях на доклиническом этапе.

Важным компонентом микробиологических испытаний, влияющим на конечный результат, являются питательные среды, используемые в процессе научного эксперимента [13, 14]. Среда Сабуро широко используется в микробиологических исследованиях с целью выделения и культивирования дрожжевых и плесневых грибов [15, 16]. В исследованиях российских ученых данная среда также применяется при определении противогрибковой активности новых соединений. Однако согласно зарубежной регламентирующей документации<sup>1</sup> для этих целей использует-

ся питательная среда RPMI-1640 с L-глутамином (далее RPMI-1640). Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. А. Н. Миронова, 2012 г.) [17] для макрометода серийных разведений рекомендуются обе жидкие среды, для микрометода – среда RPMI-1640. Однако при рекомендованных [17] микробной нагрузке (около  $5 \times 10^3$  КОЕ/мл), режиме инкубации 27 °С в течение 24 часов и методе детекции (визуально) результаты, получаемые на среде RPMI-1640, варьируют. При этом также можно отметить нелогичность использования более низкой микробной нагрузки, рекомендуемой [17] для исследовательских целей (около  $5 \times 10^3$  КОЕ/мл), при аналогичном показателе, используемом в методике, применяемой в клинической практике при оценке чувствительности клинических изолятов микромицетов к антифунгальным препаратам около  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл<sup>2</sup>.

Готовая среда RPMI-1640, имея сбалансированный аминокислотный состав, в то же время имеет низкое содержание глюкозы (0,2 %), что негативно сказывается на росте микромицетов. При приготовлении среды RPMI-1640 на основе порошка с повы-

<sup>1</sup> EUCAST Definitive Document EDef 7.3.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Available at: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAST\\_E\\_Def\\_7.3.2\\_Yeast\\_testing\\_definitive\\_revised\\_2020.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7.3.2_Yeast_testing_definitive_revised_2020.pdf). Accessed: 21.10.2022.

<sup>2</sup> Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации (2021). Доступно по: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrecdsma2021.pdf>. Ссылка активна на 21.10.2022.

шенным содержанием глюкозы (2 %) исключаются термические способы стерилизации, что требует специального оборудования. Еще одним недостатком данной среды является более высокая стоимость: цена за 1 л готовой коммерческой среды составляет 1000–5600 руб. в зависимости от производителя. Стоимость сухого бульона Сабуро в пересчете на 1 л готовой среды – 560–850 руб.

**Цель исследования:** валидировать микрометод серийных разведений с использованием жидкой среды Сабуро как альтернативы среды RPMI-1640 с L-глутамином для оптимизации экспериментальных условий определения ПГА новых соединений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании были использованы жидкая среда (бульон) Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и жидкая среда RPMI-1640 с L-глутамином, Sigma для их сравнительной оценки и подтверждения возможности применения среды Сабуро для культивирования микромицетов с целью дальнейшего определения воздействия на них веществ с противогрибковой активностью микрометодом серийных разведений.

Оценку валидационных параметров осуществляли в соответствии с принципами фармакопейной статьи<sup>1</sup>. В ходе эксперимента были выбраны и оценены такие параметры, как правильность, прецизионность (повторяемость), линейность, устойчивость, предел количественного определения [18].

Инокулюм готовили путем отбора пяти колоний из 18–24-часовых культур типового штамма *Candida albicans* NCTC 885-653. Колонии суспендировали в 5 мл стерильного 0,9%-го физиологического раствора. Полученную суспензию перемешивали в течение 15 с, плотность клеток устанавливали спектрофотометрически путем добавления стерильного физиологического раствора до достижения оптической плотности 0,5 по МакФарланду при длине волны 530 нм. Эта процедура давала дрожжевую суспензию от  $10^6$  до  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл<sup>2</sup>. Далее готовили рабочую суспензию  $1^{-5} \times 10^5$  КОЕ/мл. По 100 мкл указанного разведения культуры помещали в 100 мкл исследуемых сред, инкубировали в течение 24 часов при температуре  $35 \pm 2$  °С. Далее готовили последовательные разведе-

ния в 0,9%-м физиологическом растворе с конечным разведением  $1 \times 10^{-4}$  и  $5 \times 10^{-4}$ .

Для оценки прецизионности, правильности, линейности на поверхность агара Сабуро высевали газоном 10 мкл разведения  $5 \times 10^{-4}$  (серия I, n), 20 мкл разведения  $5 \times 10^{-4}$  (серия II, 2n) и 10 мкл разведения  $1 \times 10^{-4}$  (серия III, 5n). Посевы осуществлялись в 5 повторах в соответствии с [18] разными сотрудниками. Чашки помещали в термостат на 24 часа при температуре  $35 \pm 2$  °С. Учет производили путем подсчета выросших колоний. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statgraphics Plus, версия 5.0. Оценку полученных результатов осуществляли в соответствии с [18].

Для изучения ПГА представителя производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот микрометодом двукратных серийных разведений использовали референсную и альтернативную питательные среды. Антифунгальную активность определяли в отношении представителей *Candida* spp.: 4 типовых штаммов (*C. albicans* NCTC 885-653, *C. krusei* РКПГУ-1472/310, *C. glabrata* РКПГУ-1485/47, *C. tropicalis* РКПГУ-1513/784) и клинических изолятов, выделенных от пациентов многопрофильных клиник (*C. albicans* – 32 штамма, *C. krusei* – 4 штамма, *C. glabrata* – 1 штамм *C. tropicalis* – 1 штамм). Для приготовления дрожжевой взвеси использовали суточные культуры микромицетов, выращенные на агаре Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Концентрация дрожжевых клеток в опыте составила  $2^{-5} \times 10^5$  КОЕ/мл.

В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы инкубировали в термостате при температуре  $35 \pm 2$  °С. Оценку роста проводили визуально через 24 часа инкубирования. В качестве значения МПК (минимальной подавляющей концентрации) принимали наименьшую концентрацию соединения, при которой отсутствует видимый рост тест-организма.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Правильность**, выраженную в процентах восстановления микроорганизмов, определяли по формуле:

$$R = \frac{N}{N_0} \cdot 100 \%,$$

где  $R$  – процент восстановления микроорганизмов (%);  $N$  – количество выделенных клеток (КОЕ) на валидируемой среде (Сабуро);  $N_0$  – количество выделенных клеток (КОЕ) на референсной среде RPMI-1640 (принятое опорное значение). Процент восстановления согласно [18] должен составлять не менее 70 % от референсного значения.

<sup>1</sup> ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методов». Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/423/> Ссылка активна на 21.10.2022.

<sup>2</sup> ГОСТ Р ИСО 16256-2015 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Референтный метод для тестирования активности *in vitro* антимикробных препаратов в отношении дрожжевых грибов, вызывающих инфекционные заболевания. Утв. приказом Минздрава России от 27.04.2015 г. № 300-ст. Доступно по: <https://internet-law.ru/gosts/gost/59834>. Ссылка активна на 21.10.2022.

Результаты экспериментальной оценки *прецизионности* выражали соответствующим значением относительного стандартного отклонения – коэффициентом вариации (CV) – по формуле:

$$CV = \frac{\sigma}{X} \cdot 100 \%,$$

где  $\sigma$  – стандартное отклонение для выборки;  $X$  – среднее выборочное значение. Для используемых чашечных агаровых методов при получении более 10 КОЕ приемлемым считали коэффициент вариации не более 35 %. Данные, полученные при использовании референсной и альтернативной питательных сред, представлены в таблице 1.

В ходе оценки правильности и прецизионности валидируемой методики установлено, что указанные показатели соответствует критериям приемлемости.

Процент восстановления микроорганизмов при использовании среды Сабуро существенно превышает минимальную допустимую величину (70 %). Коэффициент вариации (случайная ошибка), используемый для оценки повторяемости метода для среды RPMI-1640 составил 23,9–27,1 %, что выше, чем для среды Сабуро – 18,3–22,4 %. Таким образом, случайная ошибка при использовании альтернативной среды ниже, чем для референсной.

*Линейность.* Оценивали способность используемого метода давать результат, прямо пропорциональный концентрации клеток микроорганизмов в образце на всем рабочем диапазоне, с использованием альтернативной и референсной среды. Обработку результатов проводили с помощью регрессионного анализа. Линейность считали доказанной, если коэффициент корреляции ( $R^2$ ) не ниже 0,90. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

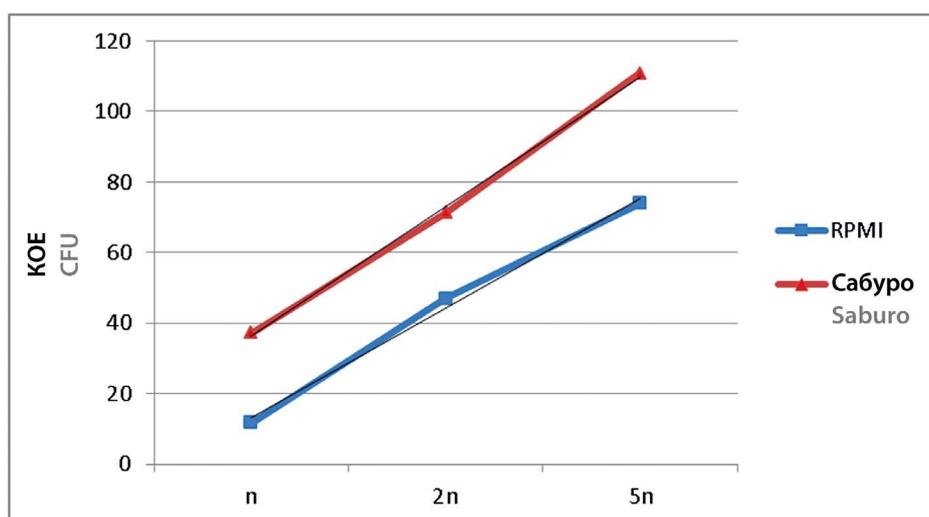


Рисунок 1. Показатели линейности валидируемого метода

Figure 1. Indicators of linearity of the method being validated

Таблица 1. Результаты определения количественного содержания жизнеспособных клеток *C. albicans* в валидируемых средах, КОЕ

Table 1. Results of quantitative determination of viable *C. albicans* cells in validated media, CFU

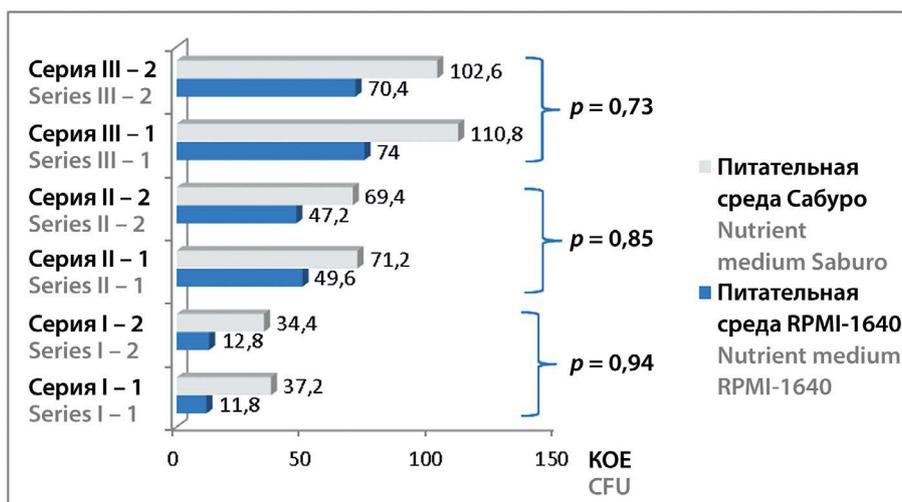
Питательная среда Nutrient medium	RPMI-1640			Среда Сабуро Medium Saburo		
	I	II	III	I	II	III
Разведения культуры Breeding culture						
Повторы Replays	13	58	75	44	90	114
	7	61	93	30	71	83
	14	33	48	48	72	131
	14	59	67	34	77	128
	11	37	87	30	46	98
Среднее Average	11,8 ± 2,9	49,6 ± 13,4	74 ± 17,7	37,2 ± 8,3	71,2 ± 15,9	110,8 ± 20,3
CV (прецизионность), % CV (precision), %	24,9	27,1	23,9	22,3	22,4	18,3
R (правильность), % R (correctness), %	–	–	–	315,2	143,5	149,7

В ходе исследования установлено, что коэффициент детерминации ( $R$ ) и коэффициент корреляции ( $R^2$ ) для среды RPMI-1640 составили 0,94 и 0,88, соответственно; для среды Сабуро – 0,97 и 0,94, что доказывает наличие линейности при использовании среды Сабуро.

**Устойчивость.** При определении устойчивости проводили сравнение результатов, полученных с использованием питательных сред различных серий и производителей [RPMI-1640 – Gibco™, Lot 1901507 (1) и Sigma Lot RNBF0725 (2); бульон Сабуро – ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия, серия 119 (1) и ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия, серия 73 (2)]. Испытания проводили в 5 повторах на трех последовательных разведениях культуры ( $n$ ,  $2n$ ,  $5n$  – серии I–III) с определением среднего арифметического количества жизнеспособных клеток (рисунок 2). Оценивали изменение прецизионности (коэффициента вариации) и правильности (процента восстановления микроорганизмов) результатов, полученных с использованием различных питательных сред методом однофакторного анализа (таблица 2).

Установлено, что отличия результатов статистически незначимы ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует об устойчивости метода с использованием обеих питательных сред (см. таблица 2).

**Предел количественного определения.** Для исследования использовали 3 разведения суспензии типового штамма *S. albicans* NCTC 885-653, культивируемого на соответствующих питательных средах при температуре  $35 \pm 2$  °C в течение 24 часов: до  $2 \times 10^1$  КОЕ/мл (I),  $4 \times 10^1$  КОЕ/мл (II),  $10^2$  КОЕ/мл (III). Разведения высевали на агар Сабуро, учет осуществляли по количеству выросших колоний через 24 часа инкубирования при температуре  $35 \pm 2$  °C. Результаты исследования представлены в таблице 1. Оценку предела количественного определения проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Установлено, что количество жизнеспособных клеток исследуемой культуры микромицета, выявленное в соответствующем разведении существенно выше при использовании среды Сабуро (рисунки 3, 4), чем в референсной среде ( $p = 0,023$ ).



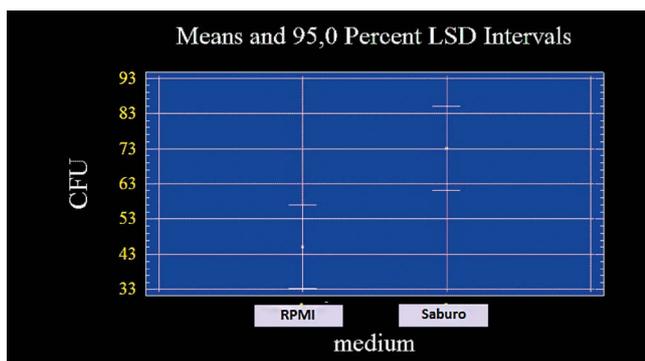
**Рисунок 2.** Результаты определения количественного содержания жизнеспособных клеток *C. albicans* в валидируемых средах разных производителей

**Figure 2.** The results of determining the quantitative content of viable *C. albicans* cells in the validated media of different series

**Таблица 2.** Результаты определения процента восстановления ( $R$ ) и коэффициента вариации ( $CV$ ) при определении устойчивости методики

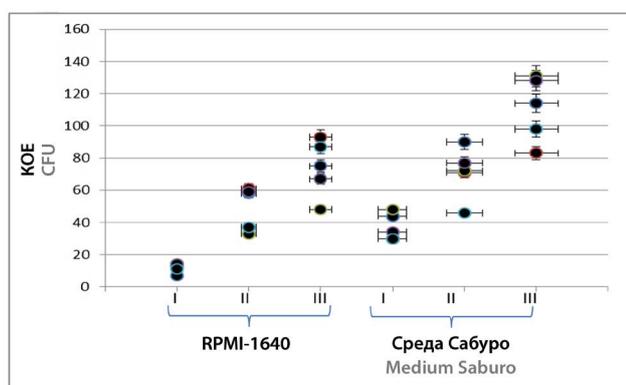
**Table 2.** The results of determining the percentage of recovery ( $R$ , trueness) and the coefficient of variation ( $CV$ , precision) when determining the robustness of the method

Питательная среда Nutrient medium	RPMI-1640	Сабуро Saburo	RPMI-1640	Сабуро Saburo	RPMI-1640	Сабуро Saburo
Серия Series	Серия I – 1/2 Series I – 1/2		Серия II – 1/2 Series II – 1/2		Серия III – 1/2 Series III – 1/2	
$CV$ (прецизионность), % $CV$ (precision), %	24,9/27,8	22,3/19,4	27,1/25,2	22,4/17,0	23,9/21,4	18,3/9,7
$R$ (правильность), % $R$ (correctness), %	315,2/268,8		143,5/147,0		149,7/145,7	



**Рисунок 3.** Результаты статистической оценки ростовых свойств среды Сабуро и RPMI-1640

**Figure 3.** Results of the statistical evaluation of the growth properties of the environment of Sabouraud and RPMI-1640



**Рисунок 4.** Результаты исследования предела количественного определения при использовании среды Сабуро и RPMI-1640

**Figure 4.** Quantitation limit results using Sabouraud's medium and RPMI-1640

Таким образом, предел количественного определения в отношении культуры *C. albicans* при культивировании в бульоне Сабуро ниже аналогичного показателя при культивировании на среде RPMI-1640, что свидетельствует о лучших ростовых свойствах альтернативной среды.

В связи с доказанной возможностью использования среды Сабуро в качестве альтернативы среде RPMI-1640 для определения противогрибковой активности новых соединений микрометодом серийных разведений ввиду наличия лучших ростовых свойств и более стабильных результатов, была изучена антифунгальная активность соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот (I) в отношении 42 представителей *Candida spp.* (типовых штаммов и клинических изолятов) в соответствии с рекомендациями [12]. Исследования осуществлялись в двух повторах. Полученные результаты (среднее арифметическое МПК) представлены в таблице 3. Изучаемое соединение проявило высокую противогрибковую активность в отношении боль-

шинства изученных штаммов *Candida spp.*, однако уступало препарату сравнения флуконазолу: МПК<sub>50</sub> соединения I составила 5,9–7,8 мг/л; МПК<sub>90</sub> – 9,8–15,6 мг/л; флуконазола – 1,5–2,9 мг/л и 11,7–23,4 мг/л соответственно. Различия в величинах МПК изучаемого соединения и флуконазола с использованием разных сред статистически недостоверны ( $p = 0,078–0,121$ ). При этом МПК изучаемого соединения в среде Сабуро несколько выше, чем в RPMI-1640.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведены валидационные исследования в отношении возможности использования жидкой среды Сабуро (бульона Сабуро) в качестве альтернативы среде RPMI-1640 с глутамином при определении противогрибковой активности новых соединений микрометодом двукратных серийных разведений. Полученные результаты оценки валидационных параметров соответствуют критериям приемлемости. Доказаны лучшие ростовые свойства среды Сабуро в отношении исследуемой культуры микромицета. Показана возможность использования данной питательной среды для определения противогрибковой активности на примере нового соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот.

## ЛИТЕРАТУРА

- Denning D. W., Kneale M., Sobel J. D., Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2018;18(11):339–347. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30103-8.
- Fatahinia M., Halvaezadeh M., Rezaei-Matehkolaei A. Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017;27(2):188–194. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.01.009.
- Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2018;35(4):171–178. DOI: 10.1016/j.riam.2018.07.002.
- Quindós G., Gil-Alonso S., Marcos-Arias C., Sevillano E., Mateo E., Jauregizar N., Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2019;24(2):172–180. DOI: 10.4317/medoral.22978.
- Riera F. O., Caeiro J. P., Angiolini S. C., Vigezzi C., Rodriguez E., Icelly P. A., Sotomayor C. E. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics*. 2022;11(7):877. DOI: 10.3390/antibiotics11070877.
- Vila T., Sultan A. S., Montelongo-Jauregui D., Jabra-Rizk M. A. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*. 2020;6(1):15. DOI: 10.3390/jof6010015.
- Гейн В. Л., Бобровская О. В., Русских А. А., Новикова В. В., Гейн О. Н., Карпенко Ю. Н., Чащина С. В., Дмитриев М. В., Янкин А. Н. Синтез и биологическая активность 5-арил-N-[[4-[[1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил]-1-фенилпиразол-3-карбоксамидов и их солей. *Журнал общей химии*. 2019;89(4):542–551. DOI:10.1134/S0044460X19040073.
- Дмитриев М. В., Иванов Д. В., Игидов Н. М., Махмудов Р. Р., Новикова В. В., Чернов И. Н. Синтез и биологическая активность моно- и дибромпроизводных 2-амино-5-(2-арил-2-оксоэтилиден)-4-оксо-1H-4,5-дигидрофуран-3-карбонновых кислот. *Журнал общей химии*. 2018;88(7):1105–1109. DOI: 10.1134/S0044460X18070089.

**Таблица 3.** Сравнительная противогрибковая активность изучаемого соединения и препарата сравнения при использовании сред Сабуро и RPMI-1640, МПК, мг/л

**Table 3.** Comparative antifungal activity of the studied compound and the reference drug using Sabouraud and RPMI-1640 media, IPC, mg/l

Штамм Strain	Среда Сабуро Medium Saburo	RPMI-1640	Штамм Strain	Среда Сабуро Medium Saburo	RPMI-1640
	I/флуконазол I/fluconazole	I/флуконазол I/fluconazole		I/флуконазол I/fluconazole	I/флуконазол I/fluconazole
C. albicans (1)	3,9/2,9	2,9/1,5	441 (22)	15,6/7,8	5,9/2,9
C. krusei (2)	2,5/62,5	0,1/31,2	624 (23)	7,8/4,9	7,8/2,0
C. glabrata (3)	3,9/15,6	1,0/5,9	629 (24)	7,8/2,9	7,8/1,5
C. tropicalis (4)	7,8/93,5	3,9/62,5	634 (25)	3,9/2,9	3,9/1,0
55 (5)	15,6/3,9	7,8/3,9	675 (26)	7,8/1,0	3,9/0,25
67 (6)	11,7/0,5	5,9/0,3	686 (27)	7,8/0,8	3,9/0,25
105 (7)	15,6/0,7	11,7/0,3	507 (28)	3,9/1,0	2,0/0,2
113 (8)	3,9/3,9	7,8/3,9	557 (29)	3,9/1,3	2,0/0,2
133 (9)	15,6/0,5	7,8/0,25	735 (30)	7,8/23,4	7,8/11,7
180 (10)	15,6/0,5	7,8/0,3	764 (31)	7,8/46,9	7,8/15,6
187 (11)	7,8/2,4	4,2/2,0	832 (32)	7,8/2,9	5,9/1,0
201 (12)	11,7/11,7	9,8/7,8	858 (33)	7,8/2,9	5,9/1,5
208 (13)	15,6/2,3	9,8/1,0	918 (34)	7,8/3,9	7,8/1,5
219 (14)	3,9/0,5	2,9/0,5	957 (35)	15,6/2,9	9,8/0,8
229 (15)	3,9/11,7	2/7,8	960 (36)	15,6/5,8	5,9/1,25
235 (16)	11,7/0,3	9,8/0,25	981 (37)	15,6/2,9	5,9/0,8
259 (17)	15,6/3,9	9,8/2,0	983 (38)	5,9/2,0	5,9/0,5
279 (18)	11,7/7,8	5,9/1,5	1031 (39)	7,8/9,7	1,0/7,8
324 (19)	3,9/23,4	3,9/11,7	1053 (40)	7,8/5,8	3,9/2,0
329 (20)	7,8/2,9	7,8/2,0	1334 (41)	3,9/2,0	2,9/0,5
337 (21)	3,9/125	7,8/15,6	1281 (42)	5,9/2,0	7,8/0,8

- Новикова В. В., Бобровская О. В., Гейн В. Л., Селиверстов Г. В., Люст Е. Н., Махмудов Р. П. Оценка противогрибковой и антибактериальной активности серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламино-сульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пирозол-3-онов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(9):34–38. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38.
- Bonifacio B. V., Machado Vila T. V., Masiero I. F., da Silva P. B., da Silva I. C., de Oliveira Lop T. M. Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2642. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02642.
- Gamal A., Chu S., McCormick T. S., Borroto-Esoda K., Angulo D., Ghannoum M. A. Ibrexafungerp, a novel oral triterpenoid antifungal in development: overview of antifungal activity against *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:642358. DOI: 10.3389/fcimb.2021.642358.
- Wall G., Lopez-Ribot J. L. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(9). DOI: 10.1128/AAC.00924-20.
- Шепелин А. П. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. *Бактериология*. 2016;1(1):42–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47.
- Bonnet M., Lagie J. C., Raoult D., Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*. 2020;34:100622. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
- Savinov V. A., Ovchinnikov R. S., Kapustin A. V., Laishevtcev A. I., Gulykin A. M. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis. *IOP Publishing*. 2019;315(2):022071. DOI: 10.1088/1755-1315/315/2/022071.
- Baranova A. A., Georgieva M. L., Bilanenko E. N., Andreev Ya. A., Rogozhin E. A., Sadykova V. S. Antimicrobial potential of alkalophilic micromycetes *Emericellopsis alkaline*. *Applied biochemistry and microbiology*. 2017;53(6):703–710.
- Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
- Гунар О. В., Сахно Н. Г., Абрамович Р. А. Основы валидации микробиологических методик фармацевтического анализа: учебное пособие. М.: РУДН; 2017. 221 с.

## REFERENCES

- Denning D. W., Kneale M., Sobel J. D., Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2018;18(11):339–347. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30103-8.
- Fatahinia M., Halvaezadeh M., Rezaei-Matehkolaei A. Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017;27(2):188–194. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.01.009.

3. Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2018;35(4):171–178. DOI: 10.1016/j.riam.2018.07.002.
4. Quindós G., Gil-Alonso S., Marcos-Arias C., Sevillano E., Mateo E., Jauregizar N., Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2019;24(2):172–180. DOI: 10.4317/medoral.22978.
5. Riera F. O., Caeiro J. P., Angiolini S. C., Vigezzi C., Rodriguez E., Iceley P. A., Sotomayor C. E. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics*. 2022;11(7):877. DOI: 10.3390/antibiotics11070877.
6. Vila T., Sultan A. S., Montelongo-Jauregui D., Jabra-Rizk M. A. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*. 2020;6(1):15. DOI: 10.3390/jof6010015.
7. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Novikova V. V., Gein O. N., Karpenko Yu. N., Chashchina S. V., Dmitriev M. V., Yankin A. N. Synthesis and biological activity of 5-aryl-N-{4-[(1,3-thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenyl}-1-phenylpyrazole-3-carboxamides and their salts. *Russian Journal of General Chemistry*. 2019;89(4):542–551. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0044460X19040073.
8. Dmitriev M. V., Ivanov D. V., Igidov N. M., Makhmudov R. R., Novikova V. V., Chernov I. N. Synthesis and biological activity of mono- and dibromo derivatives of 2-amino-5-(2-aryl-2-oxoethylidene)-4-oxo-1n-4,5-dihydrofuran-3-carboxylic acids. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(7):1105–1109. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0044460X18070089.
9. Novikova V. V., Bobrovskaya O. V., Gein V. L., Seliverstov G. V., Lyust E. N., Makhmudov R. R. Evaluation of the antifungal and antibacterial activity of silver salts of 5,6-diaryl-4-[4-(Acetylamino-sulfonyl)phenyl]-3,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-ones. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2021;84(9):34–38. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38.
10. Bonifacio B. V., Machado Vila T. V., Masiero I. F., da Silva P. B., da Silva I. C., de Oliveira Lop T. M. Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2642. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02642.
11. Gamal A., Chu S., McCormick T. S., Borroto-Esoda K., Angulo D., Ghannoum M. A. Ibrexafungerp, a novel oral triterpenoid antifungal in development: overview of antifungal activity against *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:642358. DOI: 10.3389/fcimb.2021.642358.
12. Wall G., Lopez-Ribot J. L. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(9). DOI: 10.1128/AAC.00924-20.
13. Shepelin A. P. Current state and trends in the development, production and use of nutrient media. *Bacteriologiya*. 2016;1(1):42–47. (In Russ.) DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47.
14. Bonnet M., Lagie J. C., Raoult D., Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*. 2020;34:100622. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
15. Savinov V. A., Ovchinnikov R. S., Kapustin A. V., Laishevtcev A. I., Gulykin A. M. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis. *IOP Publishing*. 2019;315(2):022071. DOI: 10.1088/1755-1315/315/2/022071.
16. Baranova A. A., Georgieva M. L., Bilanenko E. N., Andreev Ya. A., Rogozhin E. A., Sadykova V. S. Antimicrobial potential of alkalophilic micromycetes *Emericellopsis alkaline*. *Applied biochemistry and microbiology*. 2017;53(6):703–710.
17. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif and K; 2012. 944 p. (In Russ.)
18. Gunar O. V., Sakhno N. G., Abramovich R. A. Basics of validation of microbiological methods of pharmaceutical analysis: a textbook. Moscow: RUDN; 2017. 221 p. (In Russ.)

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-99-104](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-99-104)  
УДК 615.32



Оригинальная статья / Research article

## Аспекты стандартизации сока травы манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris*)

Е. В. Черемных✉, Е. В. Зорина, В. Д. Белоногова

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

✉ Контактное лицо: Черемных Елена Васильевна. E-mail: Ch1978@yandex.ru

ORCID: Е. В. Черемных – <https://orcid.org/0000-0001-7004-3805>; Е. В. Зорина – <https://orcid.org/0000-0002-7401-8196>; В. Д. Белоногова – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>.

Статья поступила: 14.10.2022    Статья принята в печать: 13.12.2022    Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Особенности химического состава и выявленные фармакологические активности субстанций из свежего сырья манжетки обыкновенной позволяют прогнозировать перспективность использования сока из травы *Alchemilla vulgaris* в медицинской практике. Создание лекарственных средств на основе соков из свежей травы манжетки предполагает разработку методов их стандартизации.

**Цель.** Определить методы качественного анализа для идентификации и количественной оценки основной группы биологически активных веществ сока манжетки обыкновенной

**Материалы и методы.** Траву манжетки для получения сока, заготавливали в период цветения в различных местах обитания. Качественный состав фенольных соединений сока изучали методом хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии (ТСХ). Методику количественного определения разрабатывали и валидировали на спектрофотометре СФ-2000.

**Результаты и обсуждение.** Хроматографией на бумаге (ХБ) в соке обнаружены производные коричневых и фенолкарбоновых кислот, группы флавоноидов с преобладанием флавонов и флавонолов, в числе доминирующих идентифицирован рутин. Методом ТСХ в системе бутанол:уксусная кислота:вода (Б:У:В) (4:1:2) добились оптимального разделения веществ и идентифицировали рутин, который предложили в качестве основного вещества при стандартизации сока. Соответствие конфигурации дифференциального спектра комплекса флавоноидов сока манжетки с алюминия хлоридом спектру аналогичного комплекса СО рутина и результаты ТСХ дают основание использовать рутин в качестве стандарта. Оптимальным вариантом при выборе аликвотной части, для количественного определения, достоверные результаты показало использование 0,2 мл сока. Содержание флавоноидов в исследуемых образцах сока составило от  $2,15 \pm 0,24$  до  $7,34 \pm 0,16$  %.

**Заключение.** ТСХ в системе БУВ (4:1:2) могут быть использованы для установления подлинности сока из травы манжетки. Параметры методики количественного определения разработаны с учетом варьирования соотношения водного компонента и сухого остатка в соке. Методика валидирована и может использоваться для стандартизации сока из травы манжетки обыкновенной. Таксация образцов сока манжетки объективной показала вариабельность содержания флавоноидов в соке в зависимости от условий произрастания.

**Ключевые слова:** спектрофотометрия, *Alchemilla vulgaris*, сок манжетки, флавоноиды, рутин

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

**Вклад авторов.** Е. В. Черемных проводила разработку и валидацию методики, участвовала в написании статьи. Е. В. Зорина участвовала в планировании эксперимента, анализе данных и написании статьи. В. Д. Белоногова участвовала в планировании эксперимента и написании статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Черемных Е. В., Зорина Е. В., Белоногова В. Д. Аспекты стандартизации сока травы манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris*). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):99–104. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-99-104](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-99-104)

## Aspects of Standardization in the Juice of the Herbs *Alchemilla vulgaris*

Elena V. Cheremnykh✉, Elena V. Zorina, V. D. Belonogova

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

✉ Corresponding author: Elena V. Cheremnykh. E-mail: Ch1978@yandex.ru

ORCID: Elena V. Cheremnykh – <https://orcid.org/0000-0001-7004-3805>; Elena V. Zorina – <https://orcid.org/0000-0002-7401-8196>; Valentina D. Belonogova – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>.

Received: 14.10.2022    Revised: 13.12.2022    Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** The features of the chemical composition and the identified pharmacological activities of substances from fresh raw materials of the *Alchemilla vulgaris* allow us to predict the prospects for the use of juice from the herb *Alchemilla vulgaris* in medical practice. The creation of drugs based on juices from fresh herb *Alchemilla* involves the development of methods for their standardization.

**Aim.** To determine the methods of qualitative analysis for the identification and quantitative assessment of the main group of biologically active substances in *Alchemilla vulgaris* juice

© Черемных Е. В., Зорина Е. В., Белоногова В. Д., 2022

© Cheremnykh E. V., Zorina E. V., Belonogova V. D., 2022

**Materials and methods.** The herb *Alchemilla vulgaris* for juice production was harvested during the flowering period in various habitats. The qualitative composition of the phenolic compounds of the juice was studied by paper chromatography and thin layer chromatography (TLC). The quantitative determination procedure was developed and validated on an SF-2000 spectrophotometer.

**Results and discussion.** Paper chromatography (CP) in the juice revealed derivatives of cinnamic and phenolcarboxylic acids, a group of flavonoids with a predominance of flavones and flavonols, rutin was identified among the dominant ones. The TLC in the butanol:acetic acid:water system (4:1:2), we achieved optimal separation of substances and identified rutin, which was proposed as the main substance in juice standardization. Correspondence of the configuration of the differential spectrum of the complex of cuff juice flavonoids with aluminum chloride to the spectrum of a similar complex of rutin SS and the results of TLC give grounds to use rutin as a standard. The best option when choosing an aliquot for quantitative determination of reliable results showed the use of 0.2 ml of juice. The content of flavonoids in the studied juice samples ranged from  $2.15 \pm 0.24\%$  to  $7.34 \pm 0.16\%$ .

**Conclusion.** TLC in the butanol-acetic acid-water system (4:1:2) can be used to authenticate the juice from the herb *Alchemilla vulgaris*. The parameters of the method of quantitative determination are developed taking into account the variation in the ratio of the water component and the dry residue in the juice. The method is valid and can be used to standardize juice from the herb *Alchemilla vulgaris*. The taxation of *Alchemilla vulgaris* juice samples showed the variability of the content of flavonoids in the juice depending on the growing conditions.

**Keywords:** spectrophotometry, *Alchemilla vulgaris*, juice, flavonoids, rutin

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

**Contribution of the authors.** Elena V. Cheremnykh conducted the development and validation of the methodology, participated in the writing of the article. Elena V. Zorina participated in the design of the experiment, data analysis and writing the article. Valentina D. Belonogova participated in the planning of the experiment and writing the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Cheremnykh E. V., Zorina E. V., Belonogova V. D. Aspects of standardization in the juice of the herbs *Alchemilla vulgaris*. *Drug development & registration*. 2022;11(4-1):99-104. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-99-104](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-99-104)

## ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования растений рода манжетка сосредоточены в основном на изучение высушенного сырья [1–3]. Предложены для внедрения в медицинскую практику настоек из травы манжетки, экстракты, обладающие гипогликемическим, гиполипидемическим, нейропротекторным, улучшающим реологию крови и другими фармакологическими эффектами [4–12]. Научный интерес представляет изучение свежего сырья манжетки обыкновенной, поскольку по качественному и количественному составу биологически активных веществ (БАВ) свежесобранное сырье не всегда эквивалентно высушенному [13]. И связано это с изменениями, вызванными условиями сушки, хранения, протеканием энзиматических процессов, воздействием кислорода воздуха и другими факторами. Целесообразность разработки лекарственных средств из свежего сырья наглядно иллюстрирует работа по изучению противовирусной активности экстракта манжетки [14]. Соки, как одна из форм переработки свежего сырья, вызывает интерес у ряда исследователей. В настоящее время изучаются соки из сырья алоэ древовидного, каланхоэ перистого, крапивы двудомной, подорожника большого, мать-и-мачехи обыкновенной, чистотела большого, побегов каллизии душистой и др. [15–18]. Перспективность разработки лекарственных средств на основе сока из травы манжетки обыкновенной продиктована выявленной у него психомоторной активностью [19].

Неотъемлемой частью этой работы является стандартизация сока.

**Цель работы.** Определить методы качественного анализа для идентификации и количественной оценки основной группы биологически активных веществ сока манжетки обыкновенной.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью получения сока надземную часть *Alchemilla vulgaris* заготавливали в период цветения в различных фитоценозах Пермского края и Кировской области. Срезали надземную часть на уровне 8–10 см от почвы, измельчали не позднее двух часов с момента среза, до частиц размером 3–5 мм, полученную массу отжимали через 4–5 слоев марли. Далее консервировали 95 % этиловым спиртом в соотношении 10:2, хранили в темном прохладном месте 14 суток, образовавшийся осадок отфильтровывали через бумажный фильтр.

Реакции обнаружения групп БАВ проводили общепринятыми методами. Изучение качественного состава фенольных соединений, полученных соков, методом хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии (ТСХ). Хроматографировали на бумаге MUNKTELL & FILTRAK GmbH (Германия) и пластинках Sorbfil марки ПТСХ-П-А-УФ; в системе растворителей: бутиловый спирт:уксусная кислота ледяная:вода (БУВ) (4:1:2), уксусная кислота ледяная:вода (УВ) (15:85). Детектировали в условиях естественного ос-

вещения и ультрафиолета (УФ-свет)  $\lambda$  365 нм и 254 нм под действием паров аммиака и после обработки раствором алюминия хлорида. Для идентификации применяли стандартный образец (СО) рутина (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия). На хроматограммы сок наносили в объеме 20 мкл и растворы СО рутина 0,05 % – 5 мкл.

Разрабатывали и валидировали методику количественного определения в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIV, на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) в программах «Сканирование» и «Кинетика». Статистическую обработку результатов осуществляли статистическими методами в соответствии с требованиями ГФ XIV<sup>1</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытуемые образцы сока имели интенсивную темную зеленовато-коричневую окраску, что затрудняло детектирование специфической окраски продуктов реакции. Разбавление сока приводило к снижению выраженности эффекта реакции. В следствие использование качественных реакций для идентификации сока нерационально.

Хроматографией на бумаге в соках травы манжетки обнаружили: флавоны и флавонолы в форме агликонов и гликозидов, метилированные формы флавоноидов, гликозиды изофлавонов, производные п-кумаровой кислоты и коричных кислот, фенолкарбоновые кислоты. Идентифицировали рутин и отметили его доминирование по размеру и интенсивности окраски зоны адсорбции по сравнению с другими веществами фенольной природы, что дает нам основание использовать рутин в качестве основного вещества при стандартизации сока манжетки.

Наиболее эффективное разделение веществ на ТСХ наблюдали в системе БУВ (4:1:2). В УФ-свете (365 нм) на хроматограмме испытуемого раствора (ИР) обнаружили 5 зон адсорбции: после обработки алюминия хлоридом желто-зеленое флюоресцирующее пятно ( $R_f$  0,70  $\pm$  0,01) по хроматографическим характеристикам соответствовало СО рутина ( $R_f$  0,72  $\pm$  0,01), выше зоны рутина два пятна с желто-зеленой флюоресценцией, фиолетовой и синей окраской. Таким образом, характеристика ТСХ имеет диагностическое значение и может быть использована при идентификации сока манжетки.

Количественное определение содержания флавоноидов в соках из травы манжетки обыкновенной проводили спектрофотометрией. Для определения длины волны изучали спектры флавоноидов сока из манжетки и рабочего стандартного образца (РСО) рутина.

Спектры собственного поглощения флавоноидов исследуемых образцов сока характеризовались нестабильным максимумом или плечом, что выражалось

в варьировании максимума от 330 до 354 нм, поэтому использовать данный спектр для определения содержания флавоноидов не представляется возможным. Отделение суммы флавоноидов от области поглощения фенолкарбоновых кислот и достижения специфического максимума удалось при использовании реакции комплексообразования с алюминия хлоридом. В результате конфигурация дифференциального спектра соответствовала спектру аналогичного комплекса СО рутина (рисунок 1). Результаты ТСХ и спектральной характеристики дают основание использовать рутин в качестве стандарта, а длину волны 405  $\pm$  2 нм в качестве аналитической.

Составными частями соков являются вода, ее содержание составляет до 80 % и вещества, растворенные в ней и находящиеся во взвешенном состоянии. Важным аспектом при разработке методов стандартизации соков является то, что соотношение водного компонента и веществ сока варьирует в зависимости от ряда факторов, сопровождающих место и время заготовки сырья [20]. В результате чего возникает проблема определения объема или массы аликвотной части сока. В поиске объективного подхода к определению доброкачественности важно было определить оптимальное агрегатное состояние испытуемого образца.

Рассматривали вариант использования в качестве навески сухого остатка, который определяется при стандартизации сока в соответствие с ОФС. Определяли оптимальную массу навески. Для этого точную навеску (г) сухого остатка сока помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили водой очищенной до метки и перемешивают (раствор А).

К 7 мл (аликвота раствора А подобрана экспериментально) раствора А добавляли 2 мл алюминия хлорида раствора 2%-го спиртового и 0,1 мл уксусной кислоты разбавленной, доводили объем водой очищенной до 25 мл.

Через 30 мин раствор сравнения (готовили без комплексообразователя) и испытуемый раствор фильтровали через бумажный фильтр и определяли оптическую плотность при 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора Б СО рутина в таких же условиях. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А СО рутина, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_{\text{ИР}} \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot a_{\text{ЛС}} \cdot V_a \cdot 25 \cdot 100},$$

где  $A_{\text{ИР}}$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $A_0$  – оптическая плотность раствора Б СО рутина;  $a_0$  – точная навеска СО рутина, г;  $a_{\text{ЛС}}$  – точная навеска сухого остатка, г;  $V_a$  – объем аликвоты, мл.

<sup>1</sup> Федеральная электронная медицинская библиотека. Раздел Государственная фармакопея». Том I. Доступно по: <http://femb.ru/feml>. Ссылка активна на 26.11.2021.

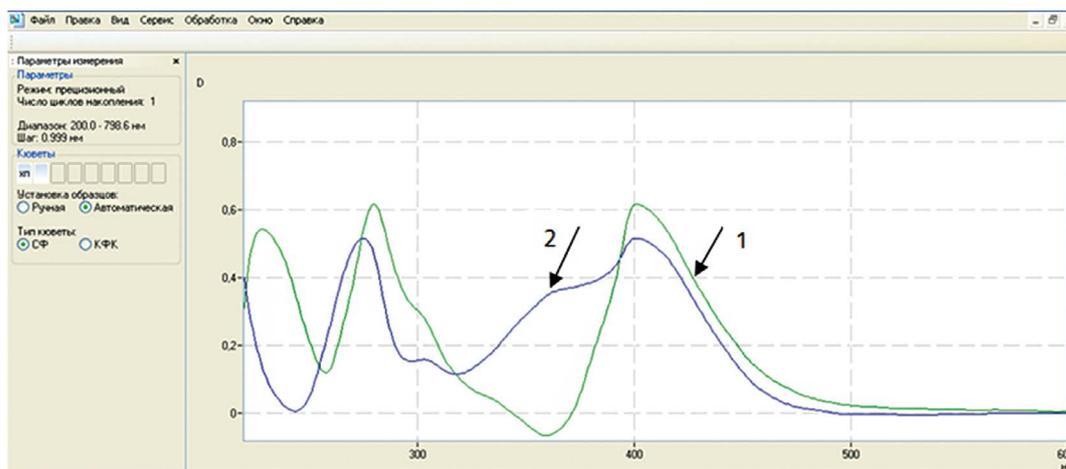


Рисунок 1. Спектры светопоглощения комплексов флавоноидов сока травы манжетки -1 и РСО рутина с  $AlCl_3$  - 2

Figure 1. Light absorption spectra of complexes of flavonoids of the juice of the herb cuff -1 and working standard sample rutin with  $AlCl_3$  - 2

Результаты выбора оптимальной навески сухого остатка сока представлены в таблице 1. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии хорошей сходимости результатов определения, вне зависимости от массы навески и невозможности ее применения для стандартизации. Причиной этому может служить высокая гигроскопичность сухого остатка. Полученные данные требуют дальнейших исследований.

При определении аликвотной части, оптимальным объемом выбран 0,2 мл сока, который подвергли комплексообразованию в соответствии с методикой и измеряли оптическую плотность. Результаты показали хорошую сходимость (таблица 2) с ошибкой 1,01 % при доверительной вероятности 95 % и отсутствии систематической ошибки.

Валидационные характеристики подтвердили линейность (коэффициент корреляции  $r = 1$ , уравнение регрессии:  $y = 0,1202x, a = 0$ ) правильность и прецизионность методики количественного определения флавоноидов в соке из травы манжетки.

Сухой остаток сока представляет собой суммарное содержание активных компонентов, которые обеспечивают фармакологические эффекты, поэтому считаем рациональным вести расчет содержания суммы флавоноидов в сухом остатке сока. Формула расчета:

$$C\% = \frac{X \cdot 100}{m_{c.o.}},$$

где  $X$  – содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин;  $m_{c.o.}$  – масса сухого остатка сока манжетки обыкновенной.

Таблица 1. Выбор навески сухого остатка сока манжетки

Table 1. Choice of weighing of the dry residue of the cuff juice *Alchemilla vulgaris*

№ образца Sample No.	Сухой остаток Dry residue	Навеска, г Suspension, g	Оптическая плотность Optical density	Стандартное отклонение Standard deviation
1	4,84 ± 0,34	0,010	0,1565	0,0129
			0,1383	
		0,023	0,2166	0,1203
			0,3868	
0,021	0,4195	0,0371		
	0,3670			
0,052		0,4890	0,0101	
		0,4746		
2	7,02 ± 0,02	0,026	0,3184	0,0204
			0,3473	
		0,052	0,9174	0,0600
			1,0023	
0,053	0,5460	0,0609		
	0,4598			
3	5,71 ± 0,10	0,053	1,0188	0,1309

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в соке манжетки

Table 2. Metrological characteristics of the method of quantitative determination of the amount of flavonoids in the juice of the *Alchemilla vulgaris*

$n$	$f$	$\bar{x}$	$S^2$	$S$	$P, \%$	$t_{f, P}$	$\Delta x$	$\epsilon, \%$
10	9	4,423	0,00437	0,06609	95	2,26	0,04728	1,01

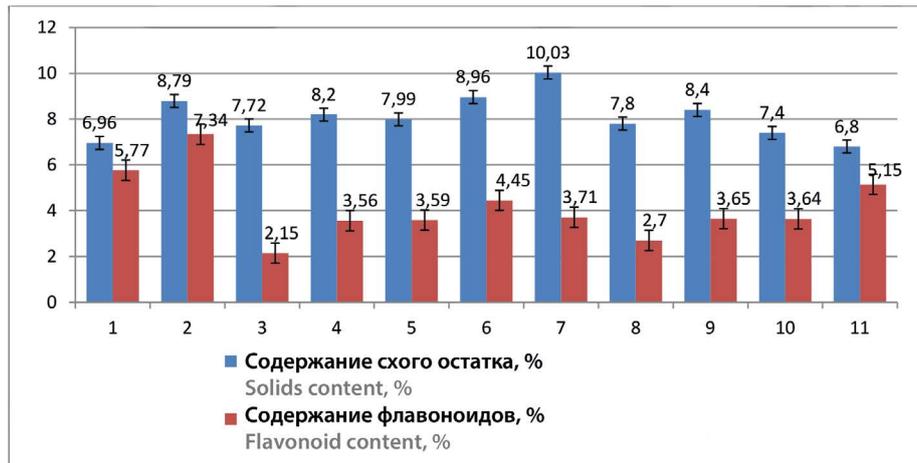


Рисунок 2. Содержание сухого остатка в 100 мл сока и флавоноидов в сухом остатке

Figure 2. The content of the dry residue in 100 ml of juice and flavonoids in the dry residue

В испытуемых образцах сока содержание флавоноидов в сухом остатке варьировало от  $2,15 \pm 0,24$  % до  $7,34 \pm 0,16$  % (Квар. = 30 %), в зависимости от места заготовки (рисунок 2). Корреляционной зависимости содержания флавоноидов и сухого остатка не выявлено ( $r = -0,171$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТСХ в системе БУВ (4:1:2) могут быть использованы для установления подлинности сока из травы манжетки. Параметры методики количественного определения разработаны с учетом варьирования соотношения водного компонента и сухого остатка в соке. Методика валидирована и может использоваться для стандартизации сока из травы манжетки обыкновенной.

Химическая таксация образцов сока манжетки эффективно показала вариабельность содержания флавоноидов в соке в зависимости от условий произрастания.

## ЛИТЕРАТУРА

- Лобанова И. Е., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А., Кукушкина Т. А., Филиппова Е. И. Виды рода *Alchemilla* L. (Rosaceae): химический состав, биологическая активность, использование в медицине (обзор). *Химия растительного сырья*. 2019;1:5–22. DOI: 10.14258/jcprtm.2019014032.
- Бояршинов В. Д., Зорина Е. В. Сравнительный анализ химического состава травы культивируемого вида манжетка мягкая (*Alchemilla mollis* (Buser) Rothm.) и дикорастущего манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.). *Химия растительного сырья*. 2022;1:115–122. DOI: 10.14258/jcprtm.20220110291.
- Живетьев М. А., Быбин В. А., Кочерыгина Е. В., Семенова Н. В., Путилина Т. Е., Дударева Л. В., Граскова И. А., Маркова Ю. А. Антимикробное действие экстрактов лекарственных растений *Andromeda polyfolia* и *Alchemilla subcrenata*. *Химия растительного сырья*. 2018;4:149–157 DOI: 10.14258/jcprtm.2018043846.
- Зорина Е. В. Фармакогностическое изучение видов рода *Alchemilla* L. Пермского края. Дис. ... канд. фарм. наук. Пермь; 2009. 217 с. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-vidov-roda-alchemilla-l-permskogo-kрая>. Ссылка активна на 10.09.2022
- Юшкова Т. А., Зорина Е. В., Белоногова В. Д. Оценка антидиабетической активности экстракта травы *Alchemilla vulgaris*. *Дневник казанской медицинской школы*. 2017;3(17):49–53.
- Шилова И. В., Суслов Н. И., Самылина И. А., Баева В. М., Лазарева Н. Б., Мазин Е. В. Нейропротекторные свойства настоя манжетки обыкновенной. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(11):37–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-37-41.
- Баева В. М. Фармакогностическое изучение лекарственных растений с использованием молекулярно-биологических методов. Автореф. дис. ... докт. фарм. наук. М.; 2009. 48 с.
- El-Hadidy E. M., Refat O. G., Halaby M. S., Elmetwaly E. M., Omar Aya A. A. Protective Effect on Lipids Profile of Lion's Foot (*Alchemilla Vulgaris*) Leaves against Ccl4Toxicity and its Fortified to Guava and Mango Pulp. *International Journal of Food Science, Nutrition and Diagnostics*. 2019;8(1):394–400. DOI: 10.19070/2326-3350-1900070.
- Vlaisavljevic S., Jelača S., Zengin G., Mimica-Dukić N., Berežni S., Milić M., Stevanovic Z. D. *Alchemilla vulgaris* agg. (Lady's mantle) from central Balkan: antioxidant, anticancer and enzyme inhibition properties. *RSC Advances*. 2019;9(64):37474–37483. DOI: 10.1039/C9RA08231J.
- Jurić T., Stanković J. S. K., Rosic G., Selakovic D., Joksimović J., Mišić D., Stanković V. D., Mihailović V. Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats. *South African Journal of Botany*. 2020;128:141–151. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.09.010.
- Шилова И. В., Суслов Н. И., Самылина И. А., Баева В. М., Лазарева Н. Б., Мазин Е. В. Нейропротекторные свойства настоя манжетки обыкновенной. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(11):37–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-37-41
- Ibrahim O. H. M., Abo-Elyousr K. A. M., Asiry K. A., Alhakamy N. A., Mousa M. A. A. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity and In Vitro Antiproliferative Potential of *Alchemilla vulgaris* Auct Root Extract against Prostate (PC-3), Breast (MCF-7) and Colorectal Adenocarcinoma (Caco-2) Cancer Cell Lines. *Plants*. 2022;11(16):2140. DOI: 10.3390/plants11162140.
- Куркин В. А., Зайцева Е. Н., Правдивцева О. Е., Шайхутдинов И. Х. Сок из свежих плодов боярышника мягковатого, обладающий диуретической активностью. Патент РФ на изобретение № 2019114928. Заявл. 15.05.2019. Бюл. № 24. Доступно по: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2698325C1\\_20190826](https://yandex.ru/patents/doc/RU2698325C1_20190826). Ссылка активна на 20.09.2022
- Мазуркова Н. А., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, по-

- лученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):9–15. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15.
15. Бадальян З. В., Темирбулатова А. М., Степанова Э. Ф. Разработка технологии и фармакологические исследования нативного сока подорожника. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2014;1–3:718–720.
  16. Фатыхова Д. Г., Карамова Н. С., Абдрахимова Й. Р., Ильинская О. Н. Исследование антигенотоксических свойств соков растений *Chelidonium majus* L., *Plantago major* L. и *Tussilago farfara* L. *Экологическая генетика*. 2010;8(2):56–65. DOI: 10.17816/ecogen8256-65.
  17. Лежнева Л. П. Реализация лечебных свойств фитокомплекса из свежесобранных листьев крапивы при разработке лекарственных форм. *Современные проблемы науки и образования*. 2011;2:24.
  18. Оленников Д. Н., Зилфикаров И. Н., Торопова А. А., Ибрагимов Т. А. Химический состав сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* wood.) и его антиоксидантная активность (in vitro). *Химия растительного сырья*. 2008;4:95–100. DOI: 10.24412/Fdio0DXS2bs.
  19. Бородина А. В., Юшкова Т. А., Зорина Е. В. Изучение психомоторной активности сока манжетки обыкновенной. В сб.: Материалы IX Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2018». Новосибирск: ИПЦ НГМУ; 2018. Т. 2. С. 331–332.
  20. Черемных Е. В., Зорина Е. В., Белоногова В. Д. Разработка показателей качества свежей травы манжетки обыкновенной. В сб.: Научно-практическая конференция с международным участием «Создание новых лекарств – от идеи до производства». 15 декабря 2021 года. Пермь: ПГФА; 2021. С. 118–121.
  10. Jurić T., Stanković J. S. K., Rosić G., Selaković D., Joksimović J., Mišić D., Stanković V. D., Mihailović V. Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats. *South African Journal of Botany*. 2020;128:141–151. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.09.010.
  11. Shilova I. V., Suslov N. I., Samylina I. A., Baeva V. M., Lazareva N. B., Mazin E. V. Neuroprotective properties of the infusion of the common cuff. *Chemico-pharmaceutical journal*. 2019;53(11):37–41. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-37-41.
  12. Ibrahim O. H. M., Abo-Elyousr K. A. M., Asiry K. A., Alhakamy N. A., Mousa M. A. A. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity and In Vitro Antiproliferative Potential of *Alchemilla vulgaris* Auct Root Extract against Prostate (PC-3), Breast (MCF-7) and Colorectal Adenocarcinoma (Caco-2) Cancer Cell Lines. *Plants*. 2022;11(16):2140. DOI: 10.3390/plants11162140.
  13. Kurkin V. A., Zaitseva E. N., Pravdivtseva O. E., Shaikhutdinov I. Kh. Juice from fresh fruits of hawthorn softish, with diuretic activity. Patent RUS No. 2019114928. Application 15.05.2019. Byul. No. 24. Available at: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2698325C1\\_20190826](https://yandex.ru/patents/doc/RU2698325C1_20190826). Accessed: 20.09.2022. (In Russ.)
  14. Mazurkova N. A., Protsenko M. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Lobanova I. E., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Agafonov A. P. Study of antiviral activity of experimental samples of drugs obtained from grass and roots of *Alchemilla vulgaris* L. against smallpox vaccine viruses and smallpox of mice. *Development and registration of medicines*. 2019;8(4):9–15 (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15.
  15. Badalyan Z. V., Temirbulatova A. M., Stepanova E. F. Development of technology and pharmacological studies of native psyllium juice. *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2014;1–3:718–720. (In Russ.)
  16. Fatykhova D. G., Karamova N. S., Abdrakhimova Y. R., Ilyinskaya O. N. Study of the antigenotoxic properties of plant juices *Chelidonium majus* L., *Plantago major* L. and *Tussilago farfara* L. *Ecological genetics*. 2010;8(2):56–65. (In Russ.) DOI: 10.17816/ecogen8256-65.
  17. Lezhneva L. P. Realization of medical properties of phytocomplex from fresh nettle leaves by working out of medicinals forms. *Modern problems of science and education*. 2011;2:24. (In Russ.)
  18. Olennikov D. N., Zilfikarov I. N., Toropova A. A., Ibragimov T. A. Chemical composition of *Callisia fragrans* wood. juice and its antioxidant activity (in vitro). *Chemistry of plant raw materials*. 2008;4:95–100. (In Russ.) DOI: 10.24412/Fdio0DXS2bs.
  19. Borodina A. V., Yushkova T. A., Zorina E. V. The study of the psychomotor activity of the juice of the cuff ordinary. In: Proceedings of the IX Russian (final) scientific and practical conference with international participation of students and young scientists "Avicenna-2018". Novosibirsk: CPI NSMU; 2018. V. 2. P. 331–332. (In Russ.)
  20. Cheremnykh E. V., Zorina E. V., Belonogova V. D. Development of indicators of the quality of the fresh grass of the common mantle. In: Scientific and practical conference with international participation "Creation of new drugs – from idea to production". December 15, 2021. Perm: PGFA; 2021. P. 118–121. (In Russ.)

## REFERENCES

1. Lobanova I. E., Vysochina G. I., Mazurkova N. A., Kukushkina T. A., Filippova E. I. Species of the genus *Alchemilla* L. (*Rosaceae*): chemical composition, biological activity and use in medicine (review). *Chemistry of Plant Raw Material*. 2019;1:5–22. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019014032.
2. Boiarshinov V. D., Zorina E. V. Comparative analysis of the chemical composition of herb cultivated *Alchemilla mollis* and wild-growing *Alchemilla vulgaris*. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2022;1:115–122. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.20220110291.
3. Zhivetyev M. A., Bybin V. A., Kocherygina E. V., Semenova N. V., Putilina T. E., Dudareva L. V., Graskova I. A., Markova Y. A. Antimicrobial activity of medicinal plant extracts *Andromeda polyfolia* and *Alchemilla subcrenata*. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;4:149–157. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018043846.
4. Zorina E. V. Pharmacognostic study of species of the genus *Alchemilla* L. Perm region. [Dissertation]. Perm; 2009. 217 p. Available at: <https://www.disserscat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-vidov-roda-alchemilla-l-permskogo-kraya>. Accessed: 10.09.2022. (In Russ.)
5. Yushkova T. A., Zorina E. V., Belonogova V. D. Evaluation of anti-diabetic activity of the herb extract *Alchemilla vulgaris*. *Diary of the Kazan Medical School*. 2017;3(17):49–53. (In Russ.)
6. Shilova I. V., Suslov N. I., Samylina I. A., Baeva V. M., Lazareva N. B., Mazin E. V. Neuroprotective properties of common cuff infusion. *Chemical and Pharmaceutical journal*. 2019;53(11):37–41. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-11-37-41.
7. Baeva V. M. Pharmacognostic study of medicinal plants using molecular biological methods. [Dissertation]. Moscow; 2009. 48 p. (In Russ.)
8. El-Hadidy E. M., Refat O. G., Halaby M. S., Elmetwaly E. M., Omar Aya A. A. Protective Effect on Lipids Profile of Lion's Foot (*Alchemilla Vulgaris*) Leaves against Ccl4Toxicity and its Fortified to Guava and Mango Pulp. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*. 2019;8(1):394–400. DOI: 10.19070/2326-3350-1900070.
9. Vlaisavljevic S., Jelača S., Zengin G., Mimica-Dukić N., Berežni S., Miljić M., Stevanovic Z. D. *Alchemilla vulgaris* agg. (Lady's mantle) from central Balkan: antioxidant, anticancer and enzyme inhibition properties. *RSC Advances*. 2019;9(64):37474–37483. DOI: 10.1039/C9RA08231J.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-105-109](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-105-109)  
УДК 615.242.017



Оригинальная статья / Research article

## Исследование противовоспалительной активности новых лекарственных форм с ацизолом

А. Л. Голованенко✉, И. П. Рудакова, Е. С. Березина, И. В. Алексеева, Е. И. Молохова

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

✉ Контактное лицо: Голованенко Анна Леонидовна. E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

ORCID: А. Л. Голованенко – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>; И. П. Рудакова – <https://orcid.org/0000-0003-2227-8313>;  
Е. С. Березина – <https://orcid.org/10000-0002-4122-2414>; И. В. Алексеева – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>;  
Е. И. Молохова – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 29.11.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Поражение твердых тканей зуба, сопровождающееся воспалительными процессами, остается на сегодняшний день актуальной медицинской и социальной проблемой для населения. Воспалительные процессы являются причиной острых болей и нередко приводят к утрате зубов, что приносит ощутимый ущерб эстетическому и функциональному состоянию зубочелюстной системы. Несмотря на большое количество созданных к настоящему времени препаратов, методик их применения, поиск и апробация новых средств для профилактики и лечения заболеваний полости рта не теряет свою актуальность и востребованность в практическом здравоохранении.

**Цель.** Целью данного исследования являлось изучение противовоспалительной активности новых стоматологических лекарственных форм с ацизолом.

**Материалы и методы.** Для исследования использовали серийные образцы гелей и пленок с активной фармацевтической субстанцией – ацизол бис-(1-винилимидазол)цинкдиацетат (ФС 000286 191211.2011, ООО «Макиз-Фарма», Россия, 101218, срок хранения 3 года); осново- и гелеобразующие компоненты – Na-KMЦ С75 (ТУ 2231-002-50277563-2000, ООО «База химической продукции «Югреактив», Россия, 151119, срок хранения 3 года), глицерол (ФС.2.2.0006.15 «Глицерин», АО «Купавнареактив», Россия, 082019, срок хранения 3 года), вода очищенная (ФС.2.2.0020.18 «Вода очищенная»), нипагин (ООО «Альфа-Вета.ком», Россия, 092018, срок хранения 3 года), нипазол (ООО «ЭКОХИМ-ИННОВАЦИИ», Россия, 071518, срок хранения 3 года). Исследования проведены на модели каррагенинового отека при наружном нанесении исследуемых лекарственных форм ацизола, модифицированной с учетом специфики лекарственных форм.

**Результаты и обсуждение.** Острую воспалительную реакцию вызывали субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1 % раствора каррагенина. Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отека, оценивали онкометрически до и через 3 часа после введения флогогенного агента. Исследуемые объекты в количестве 0,3 г наносили на кожу стопы за 0,5 часа до введения каррагенина. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 Professional. На основе полученных результатов определяли эффект торможения воспаления в процентах к контрольному уровню. О наличии противовоспалительного действия судили по выраженности торможения воспалительной реакции. Если этот показатель был больше 30 %, результат учитывался как положительный.

**Заключение.** Установлено, что пленки и гель обладают противовоспалительным эффектом, обнаруженным на модели каррагенинового отека. Полученные результаты указывают на целесообразность проведения дальнейших фармакологических исследований и дают возможность рекомендовать гель и пленки в качестве эффективного средства для профилактики и лечения заболеваний полости рта.

**Ключевые слова:** гель, пленки, ацизол, противовоспалительная активность, каррагениновый отек

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

**Вклад авторов.** А. Л. Голованенко – обзор литературы, идея и дизайн исследования, написание текста статьи. И. П. Рудакова – экспериментальные исследования, сбор и обработка данных. И. В. Алексеева – окончательная научная редакция. Е. С. Березина – статистическая обработка результатов. Е. И. Молохова – редактирование текста.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Для цитирования:** Голованенко А. Л., Рудакова И. П., Березина Е. С., Алексеева И. В., Молохова Е. И. Исследование противовоспалительной активности новых лекарственных форм с ацизолом. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4-1):105-109. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-105-109](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-105-109)

## Study of the Anti-inflammatory Activity of New Dosage Forms with Acyazol

Anna L. Golovanenko✉, Irina P. Rudakova, Elena S. Berezina, Irina V. Alekseeva, Elena I. Molokhova

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

✉ Corresponding author: Anna L. Golovanenko. E-mail: annagolovanenko@yandex.ru

ORCID: Anna L. Golovanenko – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>; Irina P. Rudakova – <https://orcid.org/0000-0003-2227-8313>;  
Elena S. Berezina – <https://orcid.org/10000-0002-4122-2414>; Irina V. Alekseeva – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>;  
Elena I. Molokhova – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>.

Received: 14.10.2022

Revised: 29.11.2022

Published: 27.12.2022

© Голованенко А. Л., Рудакова И. П., Березина Е. С., Алексеева И. В., Молохова Е. И., 2022

© Golovanenko A. L., Rudakova I. P., Berezina E. S., Alekseeva I. V., Molokhova E. I., 2022

## Abstract

**Introduction.** The defeat of hard tissues of the tooth, accompanied by inflammatory processes, remains today an urgent medical and social problem for the population. Inflammatory processes cause acute pain and often lead to loss of teeth, which causes significant damage to the aesthetic and functional state of the dental system. Despite the large number of drugs created to date, methods for their use, the search and testing of new drugs for the prevention and treatment of diseases of the oral cavity does not lose its relevance and relevance in practical healthcare.

**Aim.** The purpose of this study was to study the anti-inflammatory activity of new dental dosage forms with Acyzol.

**Materials and methods.** Serial samples of gels and films with an active pharmaceutical substance – acyzol bis-(1-vinylimidazole)цинкдиацетат (ФС 000286 191211.2011, LLC "Makiz-Pharma", Russia, 101218, shelf life 3 years) were used for the study; basic and gel-forming components – Na-KMTs C75 (ТУ 2231-002-50277563-2000, LLC "Chemical Products Base "Yugreaktiv", Russia, 151119, shelf life 3 years), glycerol (ФС.2.2.0006.15 "Glycerin", JSC "Kupavnareaktiv", Russia, 082019, shelf life 3 years), purified water (ФС.2.2.0020.18 "Purified water"), nipagin (LLC "Alfa-Veta.com", Russia, 092018, shelf life 3 years), nipazol (LLC "ECOHEM-INNOVATION", Russia, 071518, shelf life 3 years). The studies were carried out on a model of carrageenan edema during external application of the studied dosage forms of Acyzol, modified taking into account the specifics of the dosage forms.

**Results and discussion.** An acute inflammatory reaction was induced by subplantar injection of 0.1 ml of a 1 % solution of carrageenin into the hind paw of a rat. An increase in the volume of the foot, indicating the development of edema, was assessed oncometrically before and 3 hours after the administration of the phlogogenic agent. The studied objects in the amount of 0.3 g were applied to the skin of the foot 0.5 hours before the introduction of carrageenan. Statistical processing was carried out according to Student's method using Microsoft Office Excel 2010 Professional software. Based on the results obtained, the effect of inflammation inhibition was determined as a percentage of the control level. The presence of anti-inflammatory action was judged by the severity of inhibition of the inflammatory response. If this indicator was more than 30 %, the result was taken into account as positive.

**Conclusion.** It has been established that the films and the gel have an anti-inflammatory effect, which was found in the model of carrageenan edema. The results obtained indicate the feasibility of further pharmacological studies and make it possible to recommend the gel and films as an effective tool for the prevention and treatment of oral diseases.

**Keywords:** gel, films, Acyzol, anti-inflammatory activity, carrageenan edema

**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 L. Golovanenko – literature review, idea and design of the study, writing the text of the article. Irina P. Rudakova – experimental research, data collection and processing. Irina V. Alekseeva – the final scientific edition. Elena S. Berezina – statistical processing of the results. Elena I. Molokhova – text editing.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Golovanenko A. L., Rudakova I. P., Berezina E. S., Alekseeva I. V., Molokhova E. I. Study of the anti-inflammatory activity of new dosage forms with acyzol. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):105–109. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-105-109](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-105-109)

## ВВЕДЕНИЕ

Поражение твердых тканей зуба, сопровождающееся воспалительными процессами, остается на сегодняшний день актуальной медицинской и социальной проблемой для населения. Воспалительные процессы являются причиной острых болей и нередко приводят к утрате зубов, что приносит ощутимый ущерб эстетическому и функциональному состоянию зубочелюстной системы. Несмотря на большое количество созданных к настоящему времени препаратов, методик их применения, поиск и апробация новых средств для профилактики и лечения заболеваний полости рта не теряет свою актуальность и востребованность в практическом здравоохранении.

На кафедре фармацевтической технологии ПГФА в результате комплекса научно – экспериментальных исследований разработаны пленки и гель с ацизолом, представляющим собой растворимое соединение цинка с высокой биологической доступностью. Лекарственные препараты, содержащие цинк в ионизированном состоянии, обладают активностью против образования минерализованных зубных отложений, способствуют их удалению и тем самым снижают риск развития кариеса и воспалительных процессов в полости рта [1–5].

## Цель

Целью данного исследования являлось изучение противовоспалительной активности новых стоматологических лекарственных форм с ацизолом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

*Активная фармацевтическая субстанция (АФС):* ацизол бис-(1-винилимидазол)цинкдиацетат (ФС 000286 191211.2011, ООО «Макиз-Фарма», Россия, 101218 срок хранения 3 года).

*Осново- и гелеобразующий компонент:* Na-KMЦ C75 (ТУ 2231-002-50277563-2000, ООО «База химической продукции «Югреактив», Россия, 151119, срок хранения 3 года).

*Вспомогательные вещества:* глицерол (ФС.2.2.0006.15 «Глицерин», АО «Купavnareaktiv», Россия, 082019, срок хранения 3 года), вода очищенная (ФС.2.2.0020.18 «Вода очищенная»).

*Консерванты:* нипагин (ООО «Альфа-Вета.ком», Россия, 092019, срок хранения 3 года) и нипазол (ООО «ЭКОХИМ-ИННОВАЦИИ», Россия, 071519, срок хранения 3 года).

**Оборудование:** аналитические весы HR-150AG (AND, Япония); термометр лабораторный стеклянный ТЛС-5 (0–100 °С, № 00364).

## Методы

Оценка противовоспалительной активности лекарственных форм (ЛФ) проведена в опытах на животных, полученных из питомника «Андреевка» Московской области которые содержались в типовой виварии с естественным 12-часовым светотемновым циклом, при температуре воздуха  $20 \pm 2$  °С. Питание осуществлялось в соответствии с нормами кормов для экспериментальных животных с неограниченным доступом к воде с помощью специальных поилок для грызунов. Предварительно производился санитарно-химический и бактериологический анализ воды.

Исследование проводилось на нелинейных крысах обоего пола, половозрелых, массой 200–250 г, на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1 % водного раствора каррагинена [6, 7].

Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отека, оценивали онкометрически до введения и через 3 часа после введения каррагинена. Гель и пленки массой 0,3 г наносили на кожу стопы за 0,5 часа до введения каррагинена. Для проведения исследований сформированы группы животных: 1 группа – животным на поверхность задней лапы наносили пленки (предварительно смоченные в воде очищенной до состояния размягчения); 2 группа – животным на поверхность задней лапы наносили гель; 3 группа – контроль, интактные животные, 4 группа – животным на поверхность задней лапы наносили ЛФ – плацебо, 5 группа – животным на поверхность задней лапы наносили препарат сравнения гель «Метрогил Дента» (UNIQUE PHARMACEUTICAL Laboratories Индия). Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 Professional.

Противовоспалительный эффект оценивали по уменьшению отека, выраженного в процентах к контролю. Расчет производили по следующему алгоритму:

1. Рассчитывали прирост объема лапы через 3 часа после индукции воспаления по отношению к собственному фоновому значению:  $\Delta V = V_{\text{фон}} - V$  через 3 часа после введения каррагинена.
2. Рассчитывали среднее значение  $\Delta V$  по группе (М).
3. Рассчитывали долю изменения объема лапы по отношению к аналогичному показателю контрольной группы («чистый контроль»), выраженную в процентах:  $(M/M_{\text{контрольной группы}}) \times 100$  %.

На основе полученных результатов определяли эффект торможения воспаления в процентах к контрольному уровню. О наличии противовоспалительного действия судили по выраженности торможе-

ния воспалительной реакции. Если этот показатель был больше 30 %, результат учитывался как положительный.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (протокол № 3 от 18.04.2022 г.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате комплекса проведенных экспериментальных исследований на кафедре фармацевтической технологии ПГФА разработаны составы новых стоматологических ЛФ с ацизолом – геля и пленок, предложена их рациональная технология, определены показатели качества, проведена стандартизация, включая валидацию аналитических методик активной фармацевтической субстанции (АФС) и установлен предварительный срок хранения. Определена фармацевтическая доступность АФС из ЛФ информативным, быстрым и простым в исполнении кондуктометрическим методом. Исследована стабильность ЛФ при хранении и выбран упаковочный материал, позволяющий сохранить показатели качества в пределах нормы [8–11].

В качестве АФС в разработанных геле и пленках использован ацизол – бис-(1-винилимидазол)цинк-диацетат впервые синтезированный в Иркутском институте органической химии Сибирского отделения академии наук в качестве антидота угарного газа – оксида углерода. Доклинические исследования ацизола проведены на базе ФГУП Институт токсикологии ФМБА России (г. С-Петербург) с учетом современных требований к качеству, эффективности и безопасности лекарственных препаратов. Установлено, что «Ацизол» не нарушает деятельность основных адаптационных систем организма и активность ферментов, не оказывает неблагоприятного воздействия на репродуктивную функцию, не обладает сенсibiliзирующим и мутагенным действием, безопасен при контакте с кожей и слизистыми оболочками. Клинические исследования, проведенные в Московском государственном медико-стоматологическом университете, показали, что при применении «Ацизол» отсутствует изменение вкусовой чувствительности и раздражающее действие в отношении мягких тканей ротовой полости, не происходит окрашивание тканей полости рта и повышение чувствительности зубов. Установлено, что при аппликационном способе применения препарат оказывает противовоспалительное действие, укрепляет десны, уменьшает кровоточивость, нормализует микроциркуляцию в тканях десны, ускоряет репаративные процессы в слизистой оболочке полости рта и костной ткани, повышает проникновение кальция из слюнной жидкости в эмаль, входящий в состав цинк способен выступать в качестве замены ионов кальция, оказывает влияние на усиление пролиферации одонтобластов, проявляет умеренные антибактериальные и противовоспалительные свойства, оказывая ингибирующее

влияние на микробную биопленку, как одного из ключевых факторов возникновения воспалительных заболеваний тканей пародонта. В ходе изучения фармакологической активности ацизола сделан вывод о его широком спектре применения, обусловленного уникальным сочетанием катиона цинка и лиганда винилимидазола. Установленные эффекты указывают на перспективность применения ацизола в составе ЛФ для профилактики и лечения заболеваний полости рта [1, 2].

В продолжение исследований по разработке новых стоматологических ЛФ с ацизолом на кафедре физиологии ПГФА проведено определение их противовоспалительной активности. В основе выбранного метода лежит оценка прироста объема воспаленной, путем введения флогогенного агента, стопы крысы.

Исследования выполнены с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС), «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Биоэтических правил проведения исследований на человеке и животных». Содержание животных проводилось в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.), а также соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ РФ № 199 н от 01.04.2016 г. «Правила надлежащей лабораторной практики».

Результаты определения противовоспалительной активности ЛФ представлены в таблице 1.

Введение флогогенного агента вызывает существенное увеличение объема стопы животных. Прирост объема достигает 76,6 % и этот результат принят за контрольный. Применение ЛФ с ацизолом по-разному отражается на степени развития каррагенинового отека. Пленки с ацизолом уменьшают прирост объема

стопы у крыс до 27,0 %, то есть в 2,8 раза по сравнению с контрольным результатом, при использовании геля этот показатель снижается до 19,6 %, то есть в 3,9 раза. Эффективность препарата сравнения геля «Метрогил Дента» также оказалась достаточно высокой, при его применении торможение воспалительной реакции составило 45,1 %. ЛФ-плацебо не проявили противовоспалительной активности, показатель торможения процесса составляет лишь 3,9 %.

Таким образом, по сравнению с контрольными результатами выраженность воспалительного отека при применении всех ЛФ уменьшается и является статистически значимой ( $p < 0,001$ ). Противовоспалительная активность геля на основе ацизола оказалась статистически значимо большей по сравнению с эффективностью препарата сравнения, его использование позволяет получить максимальное торможение воспалительной реакции до 74,4 %. В пленках из-за более прочных структурированных межмолекулярных пространств обеспечивается существенное пролонгирование проникновения ионов цинка в ткани, в связи с этим торможение развития воспалительного отека менее выражено, чем у геля.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные новые стоматологические ЛФ с ацизолом проявили противовоспалительную активность на модели каррагенинового воспаления. Полученные результаты указывают на целесообразность проведения дальнейших фармакологических исследований и дают возможность рекомендовать гель и пленки в качестве эффективного средства для профилактики и лечения заболеваний полости рта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаниязов Х.Х., Трофимов Б.А., Нечипоренко С.П. Опыт изучения фармакологических свойств ацизола в эксперименте и клинике. *Вестник восстановительной медицины*. 2008;5:7–11

Таблица 1. Противовоспалительная активность геля и пленок с ацизолом при наружном нанесении

Table 1. Anti-inflammatory activity of the gel and films with Acyzol when applied externally

Лекарственная форма Dosage form	Прирост объема стопы через 3 часа, % Increase in foot volume after 3 hours, %	Торможение реакции через 3 часа, % Reaction inhibition after 3 hours, %
Пленки Films	27,0 ± 6,8 $p < 0,001$	64,8
Гель Gel	19,6 ± 5,3* $p < 0,001$	74,4
Лекарственная форма – плацебо Dosage form – placebo	73,6 ± 9,8 $p > 0,05$	3,9
Препарат сравнения – «Метрогил дента» Comparator drug – «Metrogyl denta»	42,1 ± 9,9 $p < 0,001$	45,1
Контроль The control	76,6 ± 7,2	

**Примечание.**  $p$  – уровень статистической значимости различий в сравнении контролем. \* Статистическая значимость различий в сравнении с гелем «Метрогил Дента».

**Note.**  $p$  – is the level of statistical significance of differences in comparison with the control. \* Statistical significance of differences in comparison with the gel "Metrogyl Dent".

2. Бобр И. С., Бабаниязов Х. Х., Дмитриева Л. А. Клиническая эффективность ацизола в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита. *Микроэлементы в медицине*. 2010;11(1):47–52.
3. Baehni P. C., Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*. 2003;9:23.
4. Orbak R., Kara C., Özbek E., Tezel A., Demir T. Effects of zinc deficiency on oral and periodontal diseases in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2007;42(2):138–143.
5. Хоменко Л. А., Биденко Н. В., Остапко Е. И. Современные средства экзогенной профилактики заболеваний полости рта. Киев: Книга Плюс; 2001. 208 с.
6. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Москва: Гриф и К; 2012. 944 с.
7. Голованенко А. Л., Рудакова И. П., Алексеева И. В., Березина Е. С., Новикова В. В. Исследование противовоспалительной активности новых лекарственных форм для лечения кариеса дентина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;2(23):58–60.
8. Голованенко А. Л., Березина Е. С. Разработка лекарственных форм реминерализующего действия с ацизолом. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2019;24:59–62.
9. Захарова А. А., Березина Е. С., Голованенко А. Л. Разработка методик испытания на подлинность и количественного определения ацизола в пленках для реминерализации эмали. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2019;23:149–150.
10. Шарнина Е. Е., Голованенко А. Л., Березина Е. С. Валидация аналитических методик определения ацизола в пленках. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2020;25:141–142.
11. Березина Е. С., Голованенко А. Л., Чукурнева Д. А. Исследования по стандартизации геля с ацизолом. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2021;27:11–13.

## REFERENCES

1. Babanijazov H. H., Trofimov B. A., Nechiporenko S. P. The experience of studying the pharmacological properties of acizole in an experiment and clinic. *Bulletin of regenerative medicine*. 2008;5:7–11. (In Russ.)
2. Bobr I. S., Babanijazov H. H., Dmitrieva L. A. Clinical efficacy of acizole in the complex treatment of chronic generalized periodontitis. *Trace elements in medicine*. 2010;11(1):47–52. (In Russ.)
3. Baehni P. C., Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*. 2003;9:23.
4. Orbak R., Kara C., Özbek E., Tezel A., Demir T. Effects of zinc deficiency on oral and periodontal diseases in rats. *Journal of Periodontal Research*. 2007;42(2):138–143.
5. Homenko L. A., Bidenko N. V., Octapko E. I. Modern remedies for exogenous prophylaxis of diseases of the oral cavity. Kiev: Kniga Pljuc; 2001. 208 p. (In Russ.)
6. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Moscow: Grif and K; 2001. 208 p. (In Russ.)
7. Golovanenko A. L., Rudakova I. P., Alekseeva I. V., Berezina E. S., Novikova V. V. Study of the anti-inflammatory activity of new dosage forms for the treatment of dentine caries. *Drug development & registration*. 2018;2(23):58–60. (In Russ.)
8. Golovanenko A. L., Berezina E. S. Development of dosage forms of remineralizing action with acyzol. *Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy*. 2019;24:59–62. (In Russ.)
9. Zakharova A. A., Berezina E. S., Golovanenko A. L. Development of methods for testing the authenticity and quantitative determination of acyzol in films for enamel remineralization. *Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy*. 2019;23:149–150. (In Russ.)
10. Sharnina E. E., Golovanenko A. L., Berezina E. S. Validation of analytical procedures for the determination of acyzol in films. *Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy*. 2020;25:141–142. (In Russ.)
11. Berezina E. S., Golovanenko A. L., Chukurneva D. A. Acizole gel standardization studies. *Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy*. 2021;27:11–13. (In Russ.)



Оригинальная статья / Research article

## Изучение хронической токсичности земляники садовой (*Fragaria ananassa*) листьев экстракта сухого

О. В. Яборова✉, А. В. Курицын, В. Д. Белоногова, И. В. Алексеева

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

✉ Контактное лицо: Яборова Ольга Владимировна. E-mail: [olyayaborova@mail.ru](mailto:olyayaborova@mail.ru)

ORCID: О. В. Яборова – <https://orcid.org/0000-0002-9995-2989>; А. В. Курицын – <https://orcid.org/0000-0001-8529-1123>;  
В. Д. Белоногова – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>; И. В. Алексеева – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>.

Статья поступила: 14.10.2022      Статья принята в печать: 05.12.2022      Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Земляники садовой листьев экстракт сухой (земляники экстракт) – одна из потенциальных субстанций для получения безопасных лекарственных средств для лечения заболеваний мочевыводящих путей, так как обладает диуретической и противовоспалительной активностью. Исследование хронической токсичности является обязательной ступенью в доклинической оценке безопасности новой фармакологической субстанции.

**Цель.** Доклинические исследования хронической токсичности субстанции – земляники экстракта.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служил земляники экстракт, полученный на ОАО «Биохиммаш». Исследование хронической токсичности земляники экстракта при длительном введении крысам выполнено в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Лабораторные животные были разделены на три группы по 15 крыс в каждой: I группа – контроль (вода); II группа – земляники экстракт в дозе 72 мг/кг; III группа – земляники экстракт – 720 мг/кг.

**Результаты и обсуждение.** В результате 3-месячного эксперимента было установлено, что земляники экстракт при внутрижелудочном введении не вызывает гибель животных и не обладает общетоксическим действием. Также земляники экстракт при внутрижелудочном применении показывает устойчивый диуретический эффект и его сохранение в течение трехмесячного эксперимента.

**Заключение.** Таким образом, была изучена хроническая токсичность земляники экстракта. Установлено, что земляники экстракт не обладает общетоксическим действием. Проведенное исследование показывает перспективность дальнейших исследований по разработке и получению лекарственных средств с земляники садовой листьев экстрактом сухим, обладающих диуретической и противовоспалительной активностью.

**Ключевые слова:** земляники садовой листьев экстракт сухой, хроническая токсичность, крысы самцы

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

**Вклад авторов.** О. В. Яборова, А. В. Курицын – статистическая обработка данных, сбор и обработка материалов, концепция и дизайн исследования. В. Д. Белоногова, И. В. Алексеева — обзор литературы, написание текста.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.

**Для цитирования:** Яборова О. В., Курицын А. В., Белоногова В. Д., Алексеева И. В. Изучение хронической токсичности земляники садовой (*Fragaria ananassa*) листьев экстракта сухого. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):110–119. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-110-119](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-110-119)

## Study of Chronic Toxicity of Strawberry Garden (*Fragaria ananassa*) Leaves of Dry Extract

Olga V. Yaborova✉, Aleksey V. Kuritsyn, Valentina D. Belonogova, Irina V. Alekseeva

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

✉ Corresponding author: Olga V. Yaborova. E-mail: [olyayaborova@mail.ru](mailto:olyayaborova@mail.ru)

ORCID: Olga V. Yaborova – <https://orcid.org/0000-0002-9995-2989>; Aleksey V. Kuritsyn – <https://orcid.org/0000-0001-8529-1123>;  
Valentina D. Belonogova – <https://orcid.org/0000-0001-5193-3976>; Irina V. Alekseeva – <https://orcid.org/0000-0003-4357-5974>.

Received: 14.10.2022      Revised: 05.12.2022      Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** Strawberry garden leaf extract dry (strawberry extract) is one of the potential substances for obtaining safe medicines for the treatment of diseases of the urinary tract, as it has diuretic and anti-inflammatory activity. The study of chronic toxicity is a mandatory step in the preclinical assessment of the safety of a new pharmacological substance.

© Яборова О. В., Курицын А. В., Белоногова В. Д., Алексеева И. В., 2022

© Yaborova O. V., Kuritsyn A. V., Belonogova V. D., Alekseeva I. V., 2022

**Aim.** Preclinical studies of the chronic toxicity of the substance – strawberry extract.

**Materials and methods.** The object of the study was strawberry extract obtained at JSC "Biohimmas". The study of the chronic toxicity of strawberry extract with prolonged administration to rats was carried out in the Laboratory of Medicinal Toxicology of the All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants in accordance with the "Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of new pharmacological Substances" [1]. Laboratory animals were divided into three groups of 15 rats each: group I – control (water); group II – strawberry extract at a dose of 72 mg/kg; group III – strawberry extract – 720 mg/kg.

**Results and discussion.** As a result of a 3-month experiment, it was found that strawberry extract with intragastric administration does not cause the death of animals and does not have a general toxic effect. Also, strawberry extract with intragastric application shows a stable diuretic effect and its preservation during a three-month experiment.

**Conclusion.** Thus, the chronic toxicity of strawberry extract was studied. It was found that strawberry extract does not have a general toxic effect. The conducted research shows the prospects for further research on the development and production of medicines from strawberry leaves with dry extract, which have diuretic and anti-inflammatory activity.

**Keywords:** strawberry garden leaf extract dry, chronic toxicity, male rats

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

**Contribution of the authors.** Olga V. Yaborova, Aleksey V. Kuritsyn – statistical data processing, collection and processing of materials, concept and design of the study. Valentina D. Belonogova, Irina V. Alekseeva — literature review, text writing.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Yaborova O. V., Kuritsyn A. V., Belonogova V. D., Alekseeva I. V. Study of chronic toxicity of strawberry garden (*Fragaria ananassa*) leaves of dry extract. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):110–119. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-110-119](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-110-119)

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем медицинской науки и практического здравоохранения является профилактика и лечение заболеваний мочевыводящих путей, которые по распространенности занимают второе место после острых респираторных заболеваний в России. Течение таких заболеваний часто имеет хронический характер и требует длительного применения лекарственных препаратов. В связи с этим, поиск и разработка новых эффективных и безопасных лекарственных средств и субстанций из растительного сырья, обладающих малой токсичностью, является актуальной задачей. Согласно данным литературы, экстракты листьев земляники садовой обладают значительной антиоксидантной активностью [1–4]. D. S. Ibrahim с соавторами на экспериментальной модели диабетической нефропатии показано положительное влияние извлечения данного растения на биохимические показатели крови экспериментальных животных [5]. В опытах *in vitro* подтверждены антимикробные свойства метанольного экстракта листьев земляники садовой [6, 7].

Современные данные свидетельствуют об актуальности доклинического изучения новых растительных субстанций и лекарственных форм на их основе. За последние годы изучена хроническая токсичность липофильных экстрактов беломорских бурых водорослей; капсул, созданных на основе винограда листьев красных экстракта сухого; лекарственного средства, созданного на основе лапчатки белой экстракта сухого, водного экстракта подмаренника настоящего, зюзника европейского экстракта сухого и др. [8–11].

В Пермской государственной фармацевтической академии на кафедре фармакогнозии из сырья ли-

стьев земляники садовой был разработан земляники садовой листьев экстракт сухой (земляники экстракт) [12–14] и получена его опытная серия на ОАО «Биохиммаш» в г. Москва. Также была изучена фармакологическая активность экстракта земляники и установлено его диуретическое и противовоспалительное действие [13, 14]. Изучение острой токсичности экстракта земляники садовой листьев сухого показало, что его можно отнести к малотоксичным веществам [13]. В связи с этим актуальными являются исследования по изучению хронической токсичности экстракта в рамках доклинических исследований и обоснования применения субстанции для дальнейшей разработки лекарственных средств на его основе.

**Цель исследования:** изучение хронической токсичности земляники садовой листьев экстракта сухого.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил земляники садовой листьев экстракт сухой, полученный на ОАО «Биохиммаш». Исследование хронической токсичности земляники экстракта при длительном введении крысам выполнено в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [1]. В связи с тем, что при исследовании «острой» токсичности крысы самцы были более чувствительны к действию субстанции земляники экстракта, изучение хронической токсичности проводилось на животных одного пола – крысах самцах [13].

Исследования проведены на 45 крысах линии Вистар с первоначальной массой тела 200–220 г. Полученные из питомника филиал «Столбовая» ГУ НЦ БМТ Московской области лабораторные животные, размещались в виварии ВНИИ лекарственных и ароматических растений и содержались в соответствии с принятыми санитарными нормами (свободный доступ к воде, гранулированный корм, нормальный температурный и световой режим). Все животные прошли двухнедельный карантин в условиях вивария. Крысы перед началом хронического опыта были здоровы [15].

Подбор животных в группы осуществляли методом случайных чисел, используя в качестве критерия массу тела так, чтобы начальная средняя масса тела не более, чем на 10 % различалась в каждой группе. Лабораторные животные были разделены на три группы по 15 крыс в каждой: I группа – контроль (вода), II группа – земляники экстракт сухой в дозе 72 мг/кг; III группа – земляники экстракт сухой 720 мг/кг. Максимальная из испытанных доз экстракта равнялась  $\approx 1/10$  от ЛД<sub>50</sub> для крыс при внутрижелудочном способе введения.

Земляники экстракт вводили животным внутрижелудочно зондом в виде 2–10 % водных растворов, приготовленных непосредственно перед введением, в объеме 1,5–5,0 мл на крысу, один раз в сутки, в течение 3 месяцев. Во время эксперимента у крыс отмечали общее состояние, двигательную активность, аппетит, динамику массы тела, состояние шерстяного покрова, реакцию на внешние раздражители. Через 1 и 3 месяца после начала введения экстракта у животных проводили исследование гематологических показателей периферической крови: общее количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов, ширина распределения эритроцитов по объему, гемограмм [16]; биохимических показателей сыворотки крови: общий белок, альбумины, общий холестерин, общий билирубин, мочевины, глюкоза, креатинин, а также активность некоторых ферментов сыворотки крови: щелочная фосфатаза, аланин- и аспартаттрансаминазы [17].

Кровь для исследований брали из хвостовой вены в объеме 1,0–1,5 мл.

Гематологические показатели периферической крови животных определяли на полуавтоматическом гематологическом анализаторе Hema-screen 13 фирмы Hospitex Diagnostics S. A. (Италия), гемограммы – на окрашенных по Романовскому – Гимзе мазках крови. Биохимические показатели и активность ферментов сыворотки крови определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе крови Screen master Techno фирмы Hospitex Diagnostics S. A. при помощи наборов фирмы Human (Германия).

В конце 1-го и 3-го месяцев для определения состояния сердечно-сосудистой системы крыс на

электрокардиографе Heart Mirror (INNOMED MEDICAL Zrt., Венгрия) снимали электрокардиограммы во II стандартном отведении. О функции почек крыс судили по результатам диуреза в условиях 3 % водной нагрузки, а центральной нервной системы – по тестам поведенческих и ориентировочных реакций в условиях «открытого поля». Эти исследования также проводили через 1 и 3 месяца эксперимента [17].

После 3-месячного введения экстракта животных подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub> камере. У них определяли коэффициенты массы и проводили патогистологическое исследование внутренних органов (срезы окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали световой микроскопией) [18]. Патогистологические исследования проведены в Институте морфологии человека РАМН под руководством член-корр. РАЕН, профессора А. П. Милованова. Все цифровые данные, полученные в эксперименте, обрабатывали методом вариационной статистики с применением t-критерий Стьюдента [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что, при внутрижелудочном введении земляники экстракта в испытанных дозах 72 мг/кг и 720 мг/кг, не зарегистрировано изменений основных интегральных показателей: крысы имели опрятный внешний вид, нормально реагировали на внешние раздражители, суточное потребление сухого корма и воды во всех группах животных соответствовало норме. Однако необходимо отметить, что в течение всего хронического эксперимента под действием земляники экстракта в обеих испытанных дозах наблюдалось некоторое замедление прибавки массы тела у животных по сравнению с контролем (таблица 1).

Во время эксперимента ни в одной из групп животных не отмечено гибели.

Введение в желудок крысам в течение 3 месяцев земляники экстракта в испытанных дозах не вызвало статистически значимых изменений гематологических показателей периферической крови: количества эритроцитов, среднего объема эритроцитов, ширины распределения эритроцитов по объему, содержания гемоглобина, среднего содержания и концентрации гемоглобина в эритроците, лейкоцитов, тромбоцитов. У животных III группы наблюдали статистически достоверное увеличение гематокрита на 1-м и 3-м месяцах исследования по сравнению с контролем (таблица 2).

При подсчете гемограмм количество различных форменных элементов крови экспериментальных животных – лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов в опытных и в контрольной группах существенно не различалось. В мазках крови не было обнаружено каких-либо патологически измененных клеток (по форме, величине, наличию патологических включений, восприятию краски (таблица 3).

**Таблица 1.** Динамика массы тела крыс, получавших интражелудочно земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 1.** Dynamics of body weight of rats receiving intragastric strawberry garden leaf extract dry in a chronic experiment

Периоды наблюдения, недели Observation periods, weeks	Группы животных Animal groups		
	I. Контроль, вода I. Control, water	II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg
2	127,4 ± 4,4	119,4 ± 4,1	117,9 ± 4,3
4	138,2 ± 5,1	128,7 ± 4,5	132,4 ± 6,9
6	144,0 ± 3,2	136,2 ± 4,8	137,1 ± 5,5
8	158,6 ± 4,6	144,8 ± 4,4	143,9 ± 5,0
10	164,2 ± 4,7	153,6 ± 5,1	148,4 ± 4,6
12	172,5 ± 5,6	156,8 ± 5,0	151,4 ± 4,9

**Таблица 2.** Показатели периферической крови крыс, получавших интражелудочно земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 2.** Indicators of peripheral blood of rats receiving intragastric strawberry garden leaf extract dry in a chronic experiment

№№ животных №№ Animals	Эритроц., ×10 <sup>12</sup> /л Erythr., ×10 <sup>12</sup> /l	Средн. объем эритроц., мкм <sup>3</sup> Average. volume of erythr., mm <sup>3</sup>	Ширина распр. эритроц. по объему, % The width of the distribution. erythr. by volume, %	Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	Среднее содерж. Hb в эритроц., г/дл Average content. Hb in erythr., pg	Средняя конц. Hb в эритроц., г/дл Average conc. Hb in erythr., g/dl	Гематокрит, % Hematokrit, %	Тромбоциты, ×10 <sup>9</sup> /л Platelets, ×10 <sup>9</sup> /l	Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, ×10 <sup>9</sup> /l
<b>1-й месяц 1st month</b>									
<i>I. Контроль, вода I. Control, water</i>									
<i>M ± m</i>	5,7 ± 0,1	54 ± 1	27,5 ± 0,4	128 ± 1	22,6 ± 0,4	41,8 ± 0,5	30,7 ± 0,4	342 ± 10	13,5 ± 0,9
<i>II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg</i>									
<i>M ± m</i>	5,8 ± 0,1	53 ± 1	26,9 ± 0,2	126 ± 3	21,7 ± 0,5	40,9 ± 0,4	30,9 ± 0,6	334 ± 13	13,8 ± 1,1
<i>III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg</i>									
<i>M ± m</i>	6,1 ± 0,2	54 ± 1	26,9 ± 0,4	129 ± 2	21,3 ± 0,7	40,7 ± 0,4	32,4 ± 0,6*	352 ± 17	15,3 ± 1,5
<b>3-й месяц 3rd month</b>									
<i>I. Контроль, вода I. Control, water</i>									
<i>M ± m</i>	6,0 ± 0,1	54 ± 1	27,4 ± 0,4	132 ± 2	22,1 ± 0,5	41,2 ± 0,5	31,2 ± 0,5	352 ± 13	10,7 ± 0,6
<i>II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg</i>									
<i>M ± m</i>	6,1 ± 0,2	53 ± 1	27,1 ± 0,4	128 ± 3	21,9 ± 0,6	41,0 ± 0,4	30,5 ± 0,7	345 ± 14	12,0 ± 0,9
<i>III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg</i>									
<i>M ± m</i>	6,3 ± 0,2	53 ± 1	27,2 ± 0,4	131 ± 2	21,4 ± 0,7	40,1 ± 0,5	32,7 ± 0,6*	357 ± 23	12,2 ± 0,7

**Примечание.** \* Достоверность различий с контролем (\*  $P < 0,05$ ).

**Note.** \* Significance of differences with control (\*  $P < 0.05$ ).

**Таблица 3.** Показатели гемограмм крыс, получавших интражелудочно земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 3.** Indicators of hemograms of rats receiving intragastric strawberry garden leaf extract dry in a chronic experiment

Группы животных Animal groups	№№ животных №№ Animals	Исследуемые показатели Investigated indicators					
		Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, ×10 <sup>9</sup> /l	Гемограммы (×10 <sup>9</sup> /л) Hemograms (×10 <sup>9</sup> /l)				Эозинофилы eosinophils
			Лимфоциты lymphocytes	Моноциты monocytes	Нейтрофилы neutrophils		
	с/ядерные c/nuclear	п/ядерные p/nuclear					
<b>1-й месяц 1st month</b>							
I. Контроль, вода I. Control, water	$M \pm m$	13,5 ± 0,9	8,9 ± 0,8	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,4	0,4 ± 0,04	0,4 ± 0,04
II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	$M \pm m$	13,8 ± 1,1	8,9 ± 0,7	0,8 ± 0,1	3,2 ± 0,4	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,04
III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	$M \pm m$	15,3 ± 1,5	9,7 ± 1,2	0,9 ± 0,1	3,6 ± 0,4	0,5 ± 0,07	0,4 ± 0,04
<b>3-й месяц 3rd month</b>							
I. Контроль, вода I. Control, water	$M \pm m$	10,7 ± 0,6	6,7 ± 0,4	0,7 ± 0,08	2,7 ± 0,4	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03
II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	$M \pm m$	12,0 ± 0,9	7,8 ± 0,8	0,7 ± 0,09	2,8 ± 0,2	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,04
III. Земляники экстракт, 72 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	$M \pm m$	12,2 ± 0,7	8,1 ± 0,8	0,8 ± 0,07	2,6 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,04

При анализе биохимических показателей сыворотки крови крыс, получавших земляники экстракт в испытанных дозах, через 1 и 3-и месяца хронического эксперимента количество различных форменных элементов крови экспериментальных животных – лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов в опытных и контрольной группах существенно не различалось. В мазках крови не было обнаружено каких-либо патологически измененных клеток – по форме, величине, наличию патологических включений, восприятию краски (таблица 4).

Определение активности некоторых ферментов сыворотки крови крыс, проведенное в те же сроки исследования, выявило статистически значимое увеличение активности аспартаттрансаминазы и щелочной фосфатазы через 1 месяц введения земляники экстракта сухого в дозе 720 мг/кг. К концу хронического опыта указанные изменения ферментов нормализовались и во всех экспериментальных группах не имели статистически значимых различий с контролем. Активность аланинтрансаминазы у крыс I–III групп статистически достоверно не различалась в оба срока исследования (таблица 5).

При исследовании влияния земляники экстракта на функциональное состояние почек экспериментальных животных в условиях водной нагрузки на 1 месяце опыта выявлено статистически значимое, по сравнению с контролем, увеличение диуреза у крыс, получавших максимальную дозу препарата, как в динамике, так и суммарно. За 5 часов проведения пробы. Подобная тенденция сохранялась и через 3 месяца эксперимента (таблица 6).

При изучении влияния земляники экстракта на функциональное состояние центральной нервной системы крыс по тестам ориентировочных реакций в условиях «открытого поля» не отмечено каких-либо изменений ни по одному из исследованных показателей (таблица 7).

Введение земляники экстракта крысам в дозах 72 и 720 мг/кг не изменяло функциональное состояние сердечно-сосудистой системы животных всех подопытных групп, о чем свидетельствовали результаты записи электрокардиограмм во II стандартном отведении, проведенной на 1 и 3-м месяце опыта (таблица 8).

После окончания введения экстракта животных подвергали эвтаназии. У них были определены коэффициенты массы внутренних органов. Из таблицы видно, что под действием субстанции препарата у крыс наблюдали увеличение относительной массы тимуса (II и III группы) по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о возможном иммуностимулирующем действии земляники садовой листьев экстракта сухого на тимус-зависимый иммунитет. Коэффициенты массы других внутренних органов крыс, представленных в таблице 9, не имели существенных различий с аналогичными показателями в контроле.

Далее проводили изучение внутренних органов крыс, получавших в течение 3-х месяцев земляники садовой листьев экстракт сухой I группа животных, контроль, вода, №№ 1–8; II группа, земляники экстракт сухой, 72 мг/кг, №№ 1–8; III группа, земляники экстракт, 720 мг/кг, №№ 1–8.) макро- и микроскопическими методами [18].

**Таблица 4.** Биохимические показатели крови крыс, получавших интражелудочно земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 4.** Biochemical blood parameters of rats receiving intragastric strawberry garden leaf extract dry in a chronic experiment

№№ животных №№ Animals	Исследуемые показатели Investigated indicators							
	Общий белок, г/л Total protein, g/l	Альбумины, г/л Albumines, g/l	Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/l	Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/l	Общий билирубин, мкмоль/л Total bilirubin, mmol/l	Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/l	Креатинин, Мкмоль/л Creatinine, Mmol/l
<b>1-й месяц 1st month</b>								
<i>I. Контроль, вода I. Control, water</i>								
<i>M ± m</i>	69,5 ± 2,1	33,3 ± 1,0	2,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	4,4 ± 0,5	67,8 ± 1,9
<i>II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg</i>								
<i>M ± m</i>	66,1 ± 3,9	32,6 ± 1,1	1,6 ± 0,1***	0,4 ± 0,1	1,7 ± 0,4	7,6 ± 0,3	4,4 ± 0,3	64,2 ± 3,3
<i>III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg</i>								
<i>M ± m</i>	75,8 ± 5,3	33,8 ± 1,3	1,7 ± 0,1*	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,5	6,3 ± 0,4***	4,9 ± 0,4	69,1 ± 2,3
<b>3-й месяц 3rd month</b>								
<i>I. Контроль, вода I. Control, water</i>								
<i>M ± m</i>	69,0 ± 1,6	34,6 ± 1,1	2,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	7,6 ± 0,4	4,5 ± 0,4	57,1 ± 4,8
<i>II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg</i>								
<i>M ± m</i>	67,7 ± 2,2	33,0 ± 1,3	1,5 ± 0,2*	0,6 ± 0,1	1,9 ± 0,2	6,0 ± 0,3**	4,6 ± 0,5	60,4 ± 6,1
<i>III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg</i>								
<i>M ± m</i>	69,9 ± 2,9	34,0 ± 1,0	1,5 ± 0,2*	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,3	5,7 ± 0,2***	4,8 ± 0,4	64,4 ± 4,6

**Примечание.** \* Достоверность различий с контролем (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,02$ ; \*\*\*  $P < 0,01$ ).

**Note.** \* Significance of differences with control (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.02$ ; \*\*\*  $P < 0.01$ ).

При визуальном исследовании – внутренние органы крыс всех экспериментальных групп правильно расположены; полости без выпота и спаек. Серозные оболочки гладкие, блестящие. Дыхательные пути свободны; легкие эластичны, воздушны, на разрезе обычной окраски. Сердце, почки, печень, селезенка, тимус, органы желудочно-кишечного тракта, надпочечники, семенники – обычной формы, консистенции, окраски, размеров.

Таким образом, патоморфологическое изучение внутренних органов крыс, получавших в течение 3 месяцев интражелудочно земляники экстракт сухой в дозах 72 мг/кг (II группа) и 720 мг/кг (III группа), а также контрольной группы (I) показало отсутствие общетоксического действия экстракта.

Изучение земляники садовой листьев экстракта сухого, проведенное согласно стандартному для доклинических исследований хронической токсичности протоколу [1–3], не выявило закономерных токсических эффектов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований, земляники садовой листьев экстракт сухой не обладает общетоксическим действием. Экстракт не раздражает слизистые желудочно-кишечного тракта экспериментальных животных.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования хронической токсичности экстракта земляники садовой листьев сухого можно сделать вывод о целесообразности дальнейших исследований безопасности и перспективности исследований по разработке и получению лекарственных средств с земляники садовой листьев экстрактом сухим, обладающих диуретической и противовоспалительной активностью, с последующим обоснованием возможности применения их в медицинской практике.

**Таблица 5.** Показатели активности некоторых ферментов сыворотки крови крыс, получавших внутрижелудочно земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 5.** Activity indicators of some serum enzymes of rats receiving intragastric strawberry garden leaf extract dry in a chronic experiment

Группы животных Animal groups	№№ животных №№ Animals	Исследуемые показатели Investigated indicators		
		Аланин-трансамилаза, Е/л Alanine Transamylase, E/L	Аспартат-трансаминаза, Е/л Aspartate Transaminase, E/L	Щелочная фосфатаза, Е/л Alkaline phosphatase, E/l
<b>1-й месяц 1st month</b>				
I. Контроль, вода I. Control, water	$M \pm m$	73,4 ± 5,8	112,2 ± 5	405 ± 28
II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	$M \pm m$	72,2 ± 6,9	117 ± 8	480 ± 34
III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	$M \pm m$	78,7 ± 2,6	128 ± 4*	506 ± 29*
<b>3-й месяц 3rd month</b>				
I. Контроль, вода I. Control, water	$M \pm m$	64,5 ± 6,2	110 ± 7	500 ± 54
II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	$M \pm m$	61,4 ± 6,4	119 ± 8	473 ± 54
III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	$M \pm m$	67,3 ± 4,9	110 ± 11	482 ± 41

**Примечание.** \* Достоверность различий с контролем (\*  $P < 0,05$ ).

**Note.** \* Significance of differences with control (\*  $P < 0.05$ ).

**Таблица 6.** Показатели диуреза (в % к водной нагрузке) у крыс, получавших земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 6.** Indicators of diuresis (in % to water load) in rats treated with strawberry leaf extract dry in a chronic experiment

Группы животных Animal groups	№№ животных №№ Animals	3 % водная нагрузка, мл 3 % water load, ml	Периоды наблюдения, часы Observation periods, hours					суммарный за 5 total for 5
			1-й first	2-й second	3-й third	4-й fourth	5-й fifth	
<b>1-й месяц 1st month</b>								
I. Контроль, вода I. Control, water	$M \pm m$	6,5 ± 0,2	58,3 ± 3,7	40,0 ± 16,2	7,0 ± 4,5	0	9,7 ± 10,4	114,9 ± 15,0
II. Земляники, экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	$M \pm m$	6,5 ± 0,2	27,1 ± 5,6	70,6 ± 13,6	20,8 ± 7,8	0	4,6 ± 3,3	123,1 ± 22,8
III. Земляники, экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	$M \pm m$	5,8 ± 0,4	69,3 ± 13,8	62,5 ± 8,2	26,6 ± 3,9	4,7 ± 5,0	6,1 ± 3,6	169,2 ± 8,6*
<b>3-й месяц 3rd month</b>								
I. Контроль, вода I. Control, water	$M \pm m$	6,5 ± 0,2	61,7 ± 15,0	38,5 ± 6,7	3,9 ± 3,6	1,1 ± 1,2	3,3 ± 2,0	108,6 ± 11,7
II. Земляники, экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	$M \pm m$	6,5 ± 0,2	67,3 ± 9,38	46,9 ± 14,6	5,1 ± 1,7	4,2 ± 2,9	1,4 ± 0,9	124,9 ± 12,4
III. Земляники, экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	$M \pm m$	5,8 ± 0,4	67,7 ± 7,6	57,5 ± 10,2	5,1 ± 1,8	6,3 ± 2,5	3,5 ± 2,6	140,1 ± 11,6

**Примечание.** \* Достоверность различий с контролем (\*  $P < 0,05$ ).

**Note.** \* Significance of differences with control (\*  $P < 0.05$ ).

**Таблица 7.** Показатели функционального состояния ЦНС крыс, получавших земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 7.** Indicators of the functional state of the central nervous system of rats treated with strawberry leaf extract dry in a chronic experiment

Исследуемые показатели (за 3 минуты) Investigated indicators (in 3 minutes)	Группы животных		
	I. Контроль, вода I. Control, water	II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg
<b>1-й месяц 1st month</b>			
«Норковый» рефлекс The «Mink» Reflex	11,4 ± 2,4	10,4 ± 0,9	11,0 ± 2,8
Вертикальный компонент Vertical component	1,2 ± 0,6	0,6 ± 0,6	0,6 ± 0,2
Число пересекаемых квадратов Number of intersecting squares	26,8 ± 5,8	26,8 ± 1,5	24,6 ± 3,4
Груминг Grooming	2,2 ± 0,9	2,8 ± 1,5	1,6 ± 1,3
Дефекация Defecation	1,4 ± 0,9	0	3,8 ± 0,6
<b>3-й месяц 3rd month</b>			
«Норковый» Рефлекс The «Mink» Reflex	12,5 ± 2,1	11,1 ± 1,6	10,7 ± 1,5
Вертикальный компонент Vertical component	1,5 ± 0,8	0,5 ± 0,5	0,4 ± 0,2
Число пересекаемых квадратов Number of intersecting squares	22,0 ± 4,5	25,2 ± 3,2	21,8 ± 3,4
Груминг Grooming	2,0 ± 6,9	2,5 ± 1,5	1,2 ± 1,0
Дефекация Defecation	1,8 ± 0,5	1,0 ± 0,5	2,6 ± 1,0

## ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «хронической» токсичности. М.: Медицина; 2005. С. 41–122.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение хронической токсичности. М.: Гриф и К; 2012. С. 17–24
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2013. 24 с.
4. Lee D. S., Kim, K. H., Yook, H. S. Cosmetic effects of the fractional extracts from strawberry (*Fragaria ananassa* var. 'Seolhyang') leaf. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2018;47(3):271–278.
5. Ibrahim D. S., Abd El-Maksoud M. A. E. Effect of strawberry (*Fragaria ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. *International Journal of Experimental Pathology*. 2015;96(2):87–93.
6. El-Mesallamy A. M. D., Hussein S. A. M., El. Gerby M., Abd El Azim M. H. M. Phenolic composition and biological activities of methanolic extract of strawberry leaves (*Fragaria ananassa*). *Natural Products: An Indian Journal*. 2013;9(6):251–257.
7. Олешко Г. И., Петухова О. В., Юшков В. В., Блинова О. А., Марченко С. Д. Способ получения средства, обладающего диуретической и противовоспалительной активностью. Патент РФ № 2342945. 2009. Бюл. № 1. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2342945C1/ru>. Ссылка активна на 14.10.2022.
8. Подосиновикова Н. П., Краснов К. А., Бондаренко А. А., Александрова М. Л., Зайцева М. А., Халаман В. В. Изучение токсичности и безопасности липофильных экстрактов беломорских бурых водорослей – фукуса пузырчатого и ламинарии сахаристой на модели *Daphnia magna* straus. *Токсикологический вестник*. 2020;4:49–55.
9. Крепкова Л. В., Бортникова В. В., Кузина О. С., Боровкова М. В., Джавахян М. А. Доклиническое изучение безопасности капсул, созданных на основе винограда листьев красных экстракта сухого. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;21(11):45–50.
10. Лемяева С. В., Бабенко, А. Н., Боровкова М. В., Кузина О. С. Доклиническое изучение безопасности лекарственного средства, созданного на основе лапчатки белой экстракта сухого. В сб.: Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». Нижний Новгород: МОБИ-ХимФарма. 2020. С. 61.
11. Демидова О. А., Архипов В. В., Журавлева М. В., Александрова Т. В., Александров А. А. Безопасность лекарственных растительных препаратов: клинико-фармакологические аспекты. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(4):165–177.
12. Яборова О. В., Соснина С. А., Турышев А. Ю. Выбор оптимальной технологии получения экстракта листьев земляники садовой сушеной. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2021;23(1):60–65.
13. Яборова О. В., Соснина С. А., Турышев А. Ю. Изучение диуретической и противовоспалительной активности настоя и экстракта сухого листьев земляники садовой. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2021;23(6):136–142.
14. Яборова О. В., Курицын А. В., Кылосова И. А., Гуляев Д. К. К вопросу изучения возможностей применения листьев и экстракта сухого земляники садовой в медицине. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2020;22(11):132–136.
15. Колик Л. Г., Жуков В. Н., Серединин С. Б. Характер проявления антиноцицептивных и анксиолитических свойств соединения ГБ-115 в аспекте взаимодействия холецистокининовой и опиоидергической систем. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2007;70(2):8–11.

Таблица 8. Параметры ЭКГ крыс, получавших внутривенно землянично садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

Table 8. ECG parameters of rats receiving intragastric strawberry garden leaf extract dry in a chronic experiment

Группы животных Animal groups	№№ животных №№ Animals	Параметры ЭКГ ECG parameters									
		R-R, сек. R-R, sec.	P-Q, сек. P-Q, sec.	QRS, сек. QRS, sec.	ST, сек. ST, sec.	TP, сек. TP, sec.	P, сек. P, sec.	R, сек. R, sec.	T, сек. T, sec.	ЧСС×в мин. Heart rate× in min.	
<b>1-й месяц 1st month</b>											
I. Контроль, вода I. Control, water	<i>M ± m</i>	0,122 ± 0,006	0,032 ± 0,002	0,034 ± 0,002	0,010 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,084 ± 0,015	0,225 ± 0,017	0,125 ± 0,011	494 ± 24	
II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	<i>M ± m</i>	0,115 ± 0,001	0,032 ± 0,002	0,032 ± 0,003	0,011 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,093 ± 0,007	0,269 ± 0,020	0,122 ± 0,007	520 ± 6	
III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	<i>M ± m</i>	0,118 ± 0,001	0,033 ± 0,001	0,030 ± 0,002	0,010 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,095 ± 0,008	0,249 ± 0,029	0,112 ± 0,008	510 ± 6	
<b>3-й месяц 3rd month</b>											
I. Контроль, вода I. Control, water	<i>M ± m</i>	0,120 ± 0,006	0,031 ± 0,001	0,032 ± 0,002	0,007 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,074 ± 0,015	0,210 ± 0,017	0,132 ± 0,011	503 ± 25	
II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	<i>M ± m</i>	0,112 ± 0,001	0,030 ± 0,002	0,031 ± 0,003	0,009 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,083 ± 0,007	0,260 ± 0,025*	0,119 ± 0,008	534 ± 6	
III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg	<i>M ± m</i>	0,116 ± 0,001	0,033 ± 0,001	0,029 ± 0,002	0,010 ± 0,002	0,010 ± 0,001	0,095 ± 0,008	0,250 ± 0,030	0,109 ± 0,011	519 ± 6	

Примечание. \* Достоверность различий с контролем (\*  $P < 0,05$ ).

Note. \* Significance of differences with control (\*  $P < 0,05$ ).

**Таблица 9.** Коэффициенты массы внутренних органов крыс (в г на 100 г массы тела), получавших земляники садовой листьев экстракт сухой в хроническом эксперименте

**Table 9.** Coefficients of the mass of the internal organs of rats (in g per 100g of body weight) who received strawberry leaf extract dry in a chronic experiment

Исследуемые органы Examined organs	Группы животных Animal groups		
	I. Контроль, вода I. Control, water	II. Земляники экстракт, 72 мг/кг II. Strawberry extract, 72 mg/kg	III. Земляники экстракт, 720 мг/кг III. Strawberry extract, 720 mg/kg
Сердце Heart	0,35 ± 0,04	0,34 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Легкие Lungs	1,15 ± 0,19	0,90 ± 0,05	0,90 ± 0,07
Печень Liver	5,54 ± 0,44	5,72 ± 0,17	6,07 ± 0,34
Почки Kidneys	0,84 ± 0,04	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,06
Селезенка Spleen	0,72 ± 0,08	0,86 ± 0,06	0,84 ± 0,03
Надпочечники Adrenal glands	0,037 ± 0,005	0,044 ± 0,001	0,048 ± 0,003
Тимус Thymus	0,19 ± 0,02	0,36 ± 0,05*	0,30 ± 0,02*
Семенники Testes	1,12 ± 0,05	1,09 ± 0,02	1,10 ± 0,03

**Примечание.** \* Достоверность различий с контролем (\*  $P < 0,05$ ).

**Note.** \* Significance of differences with control (\*  $P < 0.05$ ).

16. Козинец Г.И., Арустамян Ю.С., Ашууров Г.Д. Исследование системы крови в клинической практике. М.: Триада-Х; 1997. 480 с.
17. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз; 1963. 146 с.
18. Сапожников А. Г., Доросевич А. Е. Гистологическая и микроскопическая техника. Смоленск: САУ; 2000. 475 с.
19. Бузикашвили Н.Е., Самойлова Д.В., ред. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика; 1999. 459 с.

## REFERENCES

1. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Methodological guidelines for the study of the general toxic effect of pharmacological substances. The study of «chronic» toxicity. Moscow: Medicine; 2005. P. 41–122. (In Russ.)
2. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part one. Methodological recommendations for the study of the general toxic effect of medicines. The study of chronic toxicity. Moscow: Vulture and K; 2012. P. 17–24. (In Russ.)
3. Guidelines for the examination of medicines. Volume I. Moscow: Vulture and K; 2013. 24 p. (In Russ.)
4. Lee D. S., Kim, K. H., Yook, H. S. Cosmetic effects of the fractional extracts from strawberry (*Fragaria ananassa* var. 'Seolhyang') leaf. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2018;47(3):271–278.
5. Ibrahim D. S., Abd El-Maksoud M. A. E. Effect of strawberry (*Fragaria ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats. *International Journal of Experimental Pathology*. 2015;96(2):87–93.
6. El-Mesallamy A. M. D., Hussein S. A. M., El. Gerby M., Abd El Azim M. H. M. Phenolic composition and biological activities of methanolic extract of strawberry leaves (*Fragaria ananassa*). *Natural Products: An Indian Journal*. 2013;9(6):251–257.
7. Oleshko G. I., Petukhova O. V., Yushkov V. V., Blinova O. A., Marchenko S. D. A method for obtaining a drug with diuretic and anti-inflammatory activity. Patent RUS No. 2342945. 2009. Byul. No. 1. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2342945C1/ru>. Accessed: 14.10.2022. (In Russ.)
8. Podosinovichova N. P., Krasnov K. A., Bondarenko A. A., Alexandrova M. L., Zaitseva M. A., Halaman V. V. Study of toxicity and safety of lipophilic extracts of White Sea brown algae – *Fucus vesiculata* and *laminaria saccharum* on the model of *Daphnia magna* straus. *Toxicological Bulletin*. 2020;4:49–55. (In Russ.)
9. Krepkova L. V., Bortnikova V. V., Kuzina O. S., Borovkova M. V., Javakhyan M. A. Preclinical study of the safety of capsules created on the basis of grape leaves of red extract of dry. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2018;21(11):45–50. (In Russ.)
10. Lemyaseva S. V., Babenko A. N., Borovkova, M. V., Kuzina O. S. Preclinical study of the safety of a medicinal product created on the basis of white lapchatka extract of dry. In: Collection of Abstracts of the Sixth Interdisciplinary Conference "Molecular and Biological Aspects of Chemistry, Pharmaceutics and Pharmacology". Nizhny Novgorod: MOBI-ChemPharma. 2020. P. 61. (In Russ.)
11. Demidova O. A., Arkhipov V. V., Zhuravleva M. V., Alexandrova T. V., Alexandrov A. A. Safety of medicinal herbal preparations: clinical and pharmacological aspects. *Safety and risk of pharmacotherapy*. 2020;8(4):165–177. (In Russ.)
12. Yaborova O. V., Sosnina S. A., Turyshev A. Yu. The choice of optimal technology for obtaining dry strawberry leaf extract. *Medico-pharmaceutical journal "Pulse"*. 2021;23(1):60–65. (In Russ.)
13. Yaborova O. V., Sosnina S. A., Turyshev A. Yu. Study of diuretic and anti-inflammatory activity of infusion and extract of dry strawberry leaves. *Medical and pharmaceutical journal "Pulse"*. 2021;23(6):136–142. (In Russ.)
14. Yaborova O. V., Kuritsyn A. V., Kylosova I. A., Gulyaev D. K. On the issue of studying the possibilities of using leaves and extract of dried strawberry in medicine. *Medico-pharmaceutical journal "Pulse"*. 2020;22(11):132–136. (In Russ.)
15. Kolik L. G., Zhukov V. N., Seredenin S. B. Manifestations of the antinociceptive and anxiolytic properties of short peptide antagonist of CCK<sub>2</sub> receptors GB-115: the interaction of cholecystokinin and opioid systems. *Experimental and clinical pharmacology*. 2007;70(2):8–11. (In Russ.)
16. Kozinets G. I., Arustamyan Yu. S., Ashurov G. D. Investigation of the blood system in clinical practice. Moscow: Triad-X; 1997. 480 p. (In Russ.)
17. Belenky M. L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect. Leningrad: Medgiz; 1963. 146 p. (In Russ.)
18. Sapozhnikov A. G., Dorosevich A. E. Histological and microscopic techniques. Smolensk: SAU; 2000. 475 p. (In Russ.)
19. Buzikashvili N. E., Samoylova D. V., editors. Medical and biological statistics. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. (In Russ.)



Оригинальная статья / Research article

## Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа

О. А. Елисеева<sup>1,3✉</sup>, М. А. Колганова<sup>1</sup>, И. Е. Шохин<sup>1</sup>, С. П. Дементьев<sup>2</sup>, А. М. Власов<sup>2</sup>,  
А. А. Замятнин<sup>2</sup>, Н. С. Дубовик<sup>3</sup>, А. Ю. Савченко<sup>3</sup>, Н. В. Дозморова<sup>4</sup>, В. Г. Лужанин<sup>4</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> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ), 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

✉ Контактное лицо: Елисеева Ольга А. E-mail: o.eliseeva@cpha.ru

ORCID: О. А. Елисеева – <https://orcid.org/0000-0003-2683-6300>; М. А. Колганова – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; С. П. Дементьев – <https://orcid.org/0000-0003-3411-7293>;

А. М. Власов – <https://orcid.org/0000-0002-0742-1575>; А. А. Замятнин – <https://orcid.org/0000-0002-3046-4565>;

Н. С. Дубовик – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;

Н. В. Дозморова – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 15.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Одним из широко используемых специфических препаратов моноклональных антител с anti-HER<sub>2</sub> (human epidermal growth factor receptor 2) активностью является трастузумаб – это высокоэффективное средство для «удаления» гиперэкспрессированных единиц рецептора HER<sub>2</sub> с поверхности клеток и снижения его онкогенности. Как и для других биологических лекарственных препаратов, для трастузумаба одной из возможных нежелательных реакций со стороны иммунной системы является иммуногенность – выработка противолечекарственных антител к препарату.

**Цель.** Разработка и валидация методики полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека.

**Материалы и методы.** Полуколичественное определение антител проводилось методом иммуноферментного анализа в сочетании с техникой АСЕ, с использованием спектрофотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра.

**Результаты и обсуждения.** Разработанная методика была валидирована по показателям: предел исключения, селективность, чувствительность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность и стабильность (краткосрочная и долгосрочная). Для снижения интерференции компонентов биологической матрицы в анализе на этапе разработки было определено значение минимального необходимого разбавления (1:10). Рассчитанные значения предела исключения для этапа скрининга (фактор нормализации) и подтверждающего анализа составили 0,004 и 34,59 %, соответственно. Чувствительность разработанной методики составила 99,5 нг/мл антител к трастузумабу.

**Заключение.** Полученные при валидации методики результаты позволяют применять методику полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека для проведения аналитической части исследований безопасности препаратов трастузумаба.

**Ключевые слова:** трастузумаб, иммуногенность, биоаналоги, иммуноферментный анализ

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

**Вклад авторов.** О. А. Елисеева и М. А. Колганова участвовали в разработке и валидации методики и отвечали за написание текста статьи. А. М. Власов, С. П. Дементьев и Н. С. Дубовик отвечали за интерпретацию результатов и представление данных. И. Е. Шохин и А. Ю. Савченко отвечали за методологию исследования и рецензирование текста статьи. А. А. Замятнин, Н. В. Дозморова и В. Г. Лужанин руководили проведением исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Для цитирования:** Елисеева О. А., Колганова М. А., Шохин И. Е., Дементьев С. П., Власов А. М., Замятнин А. А., Дубовик Н. С., Савченко А. Ю., Дозморова Н. В., Лужанин В. Г. Разработка и валидация методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):120–127. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-120-127](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127)

## Development and Validation of the ELISA Method for Anti-trastuzumab Antibodies Determination in Human Serum

Olga A. Eliseeva<sup>1,3✉</sup>, Maria A. Kolganova<sup>1</sup>, Igor E. Shokhin<sup>1</sup>, Sergey P. Dementyev<sup>2</sup>,  
Alexander M. Vlasov<sup>2</sup>, Andrey A. Zamyatnin<sup>2</sup>, Natalia S. Dubovik<sup>3</sup>, Alla Yu. Savchenko<sup>3</sup>,  
Natalia V. Dozmorova<sup>4</sup>, Vladimir G. Luzhanin<sup>4</sup>

© Елисеева О. А., Колганова М. А., Шохин И. Е., Дементьев С. П., Власов А. М., Замятнин А. А., Дубовик Н. С., Савченко А. Ю., Дозморова Н. В., Лужанин В. Г., 2022

© Eliseeva O. A., Kolganova M. A., Shokhin I. E., Dementyev S. P., Vlasov A. M., Zamyatnin A. A., Dubovik N. S., Savchenko A. Yu., Dozmorova N. V., Luzhanin V. G., 2022

<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> National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

<sup>4</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

✉ **Corresponding author:** Olga A. Eliseeva. **E-mail:** o.eliseeva@cpha.ru

**ORCID:** Olga A. Eliseeva – <https://orcid.org/0000-0003-2683-6300>; Maria A. Kolganova – <https://orcid.org/0000-0003-4568-1172>;  
Igor E. Shokhin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Sergey P. Demytyev – <https://orcid.org/0000-0003-3411-7293>;  
Alexander M. Vlasov – <https://orcid.org/0000-0002-0742-1575>; Andrey A. Zamyatnin – <https://orcid.org/0000-0002-3046-4565>;  
Natalia S. Dubovik – <https://orcid.org/0000-0002-6171-2496>; Alla Yu. Savchenko – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>;  
Natalia V. Dozmorova – <https://orcid.org/0000-0001-8768-860X>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

**Received:** 14.10.2022      **Revised:** 15.12.2022      **Published:** 27.12.2022

## Abstract

**Introduction.** One of the widely used specific anti-HER<sub>2</sub> (human epidermal growth factor receptor 2) MAb drugs is trastuzumab. Trastuzumab is highly effective for malignant HER<sub>2</sub> hyperexpression reduction, which results in HER<sub>2</sub> oncogenicity decrease. As any other biotherapeutics trastuzumab can cause immunological adverse reactions, e.g. immunogenicity or anti-drug antibodies (ADAs) production.

**Aim.** The aim of this study was to develop and validate the analytical method for anti-trastuzumab antibodies determination in human blood serum.

**Materials and methods.** The semi-quantitative anti-trastuzumab antibody determination was carried out by the ELISA method combined with ACE technique, using spectrophotometric detection in the visible range of the spectrum.

**Results and discussion.** The developed method was validated for cut point, selectivity, sensitivity, "hook" effect, drug tolerance, precision and stability (short-term and long-term). To decrease the background noise from non-specific binding of sera components, the minimum required dilution value was determined at 10 % serum. The calculated values for screening cut point (normalization factor) and confirmatory cut point were 0.004 and 34.59 %, respectively. The sensitivity of the developed method was estimated at 99.5 ng/mL of anti-trastuzumab antibodies.

**Conclusion.** The obtained results allow us to use the developed ACE ELISA method for the determination of anti-trastuzumab antibodies in human serum during trastuzumab safety clinical trials.

**Keywords:** trastuzumab, immunogenicity, biosimilars, ELISA

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

**Contribution of the authors.** Olga A. Eliseeva and Maria A. Kolganova participated in the development and validation of the analytical method, and were responsible for paper draft preparation. Alexander M. Vlasov, Sergey P. Demytyev and Natalia S. Dubovik were responsible for data processing and preparation. Igor E. Shokhin and Alla Yu. Savchenko were responsible for study methodology and article text review and editing. Andrey A. Zamyatnin, Natalia V. Dozmorova, Vladimir G. Luzhanin – project supervision and administration. All authors participated in the discussion of the results and article review.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Eliseeva O. A., Kolganova M. A., Shokhin I. E., Demytyev S. P., Vlasov A. M., Zamyatnin A. A., Dubovik N. S., Savchenko A. Yu., Dozmorova N. V., Luzhanin V. G. Development and validation of the ELISA method for anti-trastuzumab antibodies determination in human serum. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):120–127. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-120-127](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127)

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространённых видов рака у женщин является рак молочной железы (РМЖ). Данное заболевание встречается примерно у каждой двенадцатой женщины в мире. Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2020 г. во всем мире было зарегистрировано свыше 2,2 миллиона случаев РМЖ<sup>1</sup>. В России за 2020 г. зарегистрировали более 69 тысяч случаев рака молочной железы, при этом РМЖ занимал лидирующие позиции в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения, составляя 21,7 % от всех случаев злокачественных новообразований у женщин [1]. Между тем, именно ранняя диагностика РМЖ зачастую во многом

определяет исход болезни – при выявлении заболевания на ранней стадии, лечение становится более эффективным и повышает выживаемость пациентов. Всего выделяют четыре основных молекулярных подтипа рака молочной железы: люминальный А, люминальный Б, HER<sub>2</sub>-позитивный и тройной негативный РМЖ. Терапия первой линии для рака молочной железы обычно включает в себя лучевую и химиотерапию, хирургическое вмешательство для эрадикации опухоли, а также таргетные противораковые лекарственные препараты.

В настоящее время таргетная терапия используется все чаще и включает в себя использование биологических, и в том числе биотехнологических лекарственных препаратов, например, препаратов на основе технологии моноклональных антител (МкАТ). Одним из таких препаратов является трастузумаб. В качестве первого терапевтического МкАТ, нацеленного на рецептор HER<sub>2</sub>, трастузумаб произвел революцию в лечении HER<sub>2</sub>-позитивного рака молочной

<sup>1</sup> WHO fact sheet "Cancer". Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Accessed: 16.11.2021

железы, а впоследствии и некоторых других типов рака, связанных с гиперэкспрессией рецептора HER<sub>2</sub> [2]. Трастузумаб – это гуманизированные МкАТ подкласса IgG<sub>1</sub>, получаемые по рекомбинантной технологии и содержащие мышинные CDR-фрагменты, слитые с фрагментами человеческих антител [3]. В случае HER<sub>2</sub>-позитивного РМЖ число единиц рецептора на поверхности клеток увеличивается в сотни раз, тогда как в норме число рецепторов HER<sub>2</sub> на поверхности эпителиальных клеток составляет около 20 тысяч [4, 5]. При гиперэкспрессии рецепторы HER<sub>2</sub> на мембране нарушают нормальный клеточный цикл и позволяют раковым клеткам бесконтрольно делиться, в результате чего у пациентов снижается эффективность химиотерапии и уменьшается безрецидивная и общая выживаемость [6, 7]. Ингибируя гиперэкспрессию рецептора HER<sub>2</sub> на поверхности опухолевых клеток, трастузумаб снижает онкогенность рецептора.

На данный момент трастузумаб является «золотым стандартом», одобренным FDA, для лечения HER<sub>2</sub>-позитивного РМЖ [8]. При этом препарат обладает довольно высокой стоимостью (около 30 тысяч евро за 12-месячное лечение в адъювантных условиях и около 42 тысяч евро за средний период лечения 18,5 месяцев при метастатическом раке молочной железы для пациента весом примерно 67 кг), что является существенной нагрузкой для бюджетов системы здравоохранения и может ограничить доступ к препарату для некоторых пациентов [9]. Одним из вариантов решения данной проблемы может стать разработка и регистрация биоаналоговых лекарственных препаратов.

Терапия биологическими препаратами, в том числе препаратами-биоаналогами, несет в себе не только потенциальную пользу для пациентов, но и существенные риски. Биологические лекарственные средства могут вызывать нежелательные явления, и в том числе спровоцировать иммунный ответ организма – выработку противолекарственных антител (anti-drug antibodies, ADA). Выработка ADA может влиять на эффективность препарата, изменяя его фармакокинетику и/или фармакодинамику, а также на его безопасность и переносимость. В данном случае комплексный анализ данных об иммуногенности может иметь решающее значение для понимания природы возможных побочных реакций. Поэтому анализ иммуногенности биологических препаратов – это не только важный аспект доказательств биоаналогичности, закрепленный в нормативной документации, но и инструмент для обоснования клинических решений. Таким образом, еще на этапе клинических исследований необходимо разрабатывать и валидировать надежные методики анализа иммуногенности [10].

**Целью данной работы** являлась разработка и валидация методики полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови чело-

века методом иммуноферментного анализа (ИФА) для целей сравнительной оценки иммуногенности препарата-биоаналога трастузумаба.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стандартного образца (положительный контроль антител к трастузумабу) при разработке и валидации методики использовали антиидиотипические, нейтрализующие моноклональные антитела к трастузумабу подкласса IgG<sub>1</sub> (human anti-trastuzumab antibodies), с концентрацией белка 0,5 мг/мл (Bio-Rad, США). Стандартный образец хранили в морозильнике при температуре  $-40 \pm 10$  °С.

В качестве препарата сравнения и исследуемого препарата в исследовании выступали оригинальный препарат Герцептин® и его биоаналог:

- *исследуемый препарат*: Трастузумаб; лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий; 440 мг/20 мл;
- *препарат сравнения*: Герцептин® (МНН: Трастузумаб); лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий; 440 мг/20 мл.

Образцы исследуемого препарата и препарата сравнения хранили в холодильнике фармацевтическом при температуре 2–8 °С.

## Оборудование

В ходе разработки и валидации методики для определения оптической плотности образцов в лунках ИФА-планшета использовали планшетный иммуноферментный анализатор STAT FAX 3200 (Awareness Technology, Inc., США). В качестве вспомогательного оборудования использовали: автоматический промыватель планшетов «Акварин» (ЗАО «Вектор-Бест-Европа», Россия), термощейкер для планшетов (BioSan, Латвия), встряхиватель типа Вортек Reax Top (Heidolph Instruments GmbH, Германия), весы аналитические Pioneer PA 214C (OHAUS Corporation, США), одноканальные и многоканальные дозаторы различного объема (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия), рН-метр-милливольтметр (ООО «НПО Аквилон», Россия) и колбы мерные класса А, цилиндры мерные различной вместимости (Shott Duran, Германия). Воду очищенную 1 типа получали с помощью системы водоподготовки «Аквалаб» AL-1 (Россия). Хранение реактивов и образцов осуществляли в холодильнике фармацевтическом ХФ-400-2 (АО «ПОЗИС», Россия) и морозильнике микропроцессорном для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов ММ-180/20/35 «POZIS» (АО «ПОЗИС», Россия).

## Реактивы

В ходе валидации методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека использовали следующие реактивы: антитела к трастузума-

бу (положительный контроль) human anti-trastuzumab, 0,5 мг/мл (HCA177, Bio-Rad, США); вода очищенная тип 1; бычий сывороточный альбумин (БСА, рН = 7,0, ≥98 % pure, A9647, Sigma-Aldrich, США); набор для биотинилирования антител (ООО «Силекс», Россия); конъюгат стрептавидин-пероксидаза, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ)-субстрат (ООО «ИМТЕК», Россия); калия хлорид (х.ч.), натрия хлорид (х.ч.), калия дигидрофосфат (ч.д.а.), натрия карбонат (ч.) (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия гидрофосфат (pure, pharma grade), натрия гидрокарбонат (pure, pharma grade) твин-20 (pure, pharma grade, PanReac, Испания); глицин (pure EP USP, ≥98,5 %, ООО «Диаэм», Россия), трис-(гидроксиметил)-аминометан (≥99,0 %, T1378, Sigma-Aldrich, США); серная кислота концентрированная (ООО «ХИММЕД СИНТЕЗ», Россия); планшеты 96-луночные, прозрачные, плоскодонные, высокое связывание Costar® (2592, Corning Inc., США).

### Методика полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА

Полуколичественное определение антител к трастузумабу в сыворотке крови человека проводили с помощью планшетного иммуноферментного анализатора STAT FAX 3200 (Awareness Technology, Inc., США). Краткая схема анализа приведена в таблице 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Разработка методики

В ходе разработки методики определяли оптимальную концентрацию покрытия планшета трастузумабом, проводили оценку применимости условий кислотной диссоциации образцов, как способа улучшения толерантности методики к присутствию в образцах трастузумаба, подбирали состав, рН и рабочий объем буфера для нейтрализации в лунках планшета, а также устанавливали оптимальные условия инкубации планшета на разных этапах анализа (длительность, число оборотов шейкера, температура). Кроме того, в ходе разработки методики определяли оптимальные разведения первичного (биотинилированный трастузумаб) и вторичного (конъюгат стрептавидин: пероксидаза) детектирующих реактивов, анализируя получаемые в каждом случае соотношения «сигнал-шум» относительно образцов отрицательного контроля (пулированная интактная сыворотка крови человека). Финальным этапом разработки методики стал выбор минимального необходимого разведения (MRD) образцов сыворотки, позволяющего уменьшить интерференцию компонентов сыворотки, но сохранить при этом требуемые значения чувствительности методики. В методике использовали 10 % сыворотку крови, то есть MRD составило 1 : 10.

Таблица 1. Краткая схема анализа

Table 1. Brief assay scheme

№ этапа Step No.	Содержание этапа анализа Assay procedures
1	Покрывание планшета (100 мкл/лунка, 40 мкг/мл трастузумаба в карбонатном буфере) Plate coating (100 µl/well, 40 µg/ml trastuzumab in carbonate buffer)
2	Кислотная диссоциация образцов (образцы, разбавленные в соответствии с MRD в глициновом буфере, 37 °C, 20 минут, 500 rpm) Acid dissociation of samples (samples diluted according to MRD in glycine buffer, 37°C, 20 minutes, 500 rpm)
3	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
4	Внесение образцов (по 100 мкл/лунка, в дублях, предварительное внесение в лунки буфера для нейтрализации на основе триса, рН = 9,5. В случае подтверждающего анализа в буфер для нейтрализации добавляли трастузумаб, 2 мг/мл) Introduction of sample (100 µl/well, in duplicate, wells pre-sprayed with Tris-based neutralization buffer, pH = 9.5. Trastuzumab, 2 mg/ml, added to neutralization buffer for confirmatory assay)
5	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
6	Элюирование и иммобилизация антител (глициновый буфер, 37 °C, 20 минут, 500 rpm; перенос в новый планшет инкубация 60 мин, 37 °C, 500 rpm) Elution and immobilization of antibodies (glycine buffer, 37 °C, 20 minutes, 500 rpm; transfer to a new plate, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
7	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
8	Блокирование планшета (250 мкл/лунка, 1 % раствор БСА, инкубация 60 минут, 37 °C, 500 rpm) Plate blocking (250 µl/well, 1 % BSA solution, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
9	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
10	Первичный детектирующий реагент, биотинилированный трастузумаб (100 мкл/лунка, инкубация 60 минут, 37 °C, 500 rpm) Primary detection reagent, biotinylated trastuzumab (100 µl/well, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
11	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
12	Вторичный детектирующий реагент конъюгат стрептавидин: пероксидаза (100 мкл/лунка, инкубация 60 минут, 37 °C, 500 rpm) Secondary detection reagent streptavidin:peroxidase conjugate (100 µl/well, incubation 60 minutes, 37 °C, 500 rpm)
13	Промывка планшета (3 раза, промывочный буфер с твином-20) Plate washes (3 times, wash buffer with Tween-20)
14	Внесение ТМБ-субстрата (100 мкл/лунка, инкубация 30 минут, 300 rpm) Introduction of TMB-substrate (100 µl/well, incubation 30 minutes, 300 rpm)
15	Внесение стоп-реагента (100 мкл/лунка), измерение оптической плотности (450 нм/630 нм) Introduction of Stop Reagent (100 µl/well), Optical Density Measurement (450 nm/630 nm)

## Валидация методики

Валидацию методики полуколичественного определения антител к трастузумабу проводили в соответствии с руководством FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection<sup>1</sup> и Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза<sup>2</sup> по следующим параметрам:

### Предел исключения (cut point)

Предел исключения определяли в ходе анализа 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, которые были проанализированы двумя аналитиками, в течение 5 дней, одновременно в формате скрининга и подтверждающего анализа. Помимо индивидуальных образцов интактной сыворотки крови, каждый цикл включал образцы положительного контроля (PC-1 и PC-2 с концентрациями антител к трастузумабу 1000 нг/мл и 500 нг/мл, соответственно) для контроля пригодности циклов, а также образцы отрицательного контроля (NC – пулированная интактная сыворотка крови человека). Полученные в ходе анализа значения оптической плотности (для этапа скрининга) и % ингибирования (для подтверждающего анализа) подвергали статистической обработке с целью расчета значений предела исключения (cut-point) методики. Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО IBM SPSS Statistics.

### Предел исключения для этапа скрининга

Для определения предела исключения для этапа скрининга все полученные значения оптической плотности (ОП) подвергали проверке на нормальное распределение (тест Шапиро-Уилка), после чего проводили log-преобразование данных и исключали выбросы с помощью метода Тьюки. После повторной проверки на нормальное распределение проводили расчет валидационного cut point непа-

<sup>1</sup> Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), January 2019. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug>. Accessed: 12.12.2022

<sup>2</sup> Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской Экономической Комиссии №89, от 3 ноября 2016 г. Доступно по: <http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/8903111.pdf> Ссылка активна на 12.12.2022.

раметрическим методом. На втором этапе проводили оценку гомогенности дисперсий (статистика Ливиня) и сравнение средних (ANOVA) между циклами и между аналитиками. На основании полученных данных для дальнейшего использования в анализе был выбран плавающий предел исключения для этапа скрининга (floating screening cut-point). Возможность использования плавающего предела исключения и фактора нормализации была подтверждена с использованием корреляции Пирсона, значение корреляции составило 0,891 (>0,7). Для дальнейших расчетов предела исключения каждого конкретного цикла (PSCP – plate-specific cut-point) был рассчитан фактор нормализации (NF), который составил 0,004. В ходе дальнейшего анализа PSCP рассчитывали как сумму среднего значения ОП образцов отрицательного контроля и фактора нормализации.

### Предел исключения для подтверждающего анализа

Для определения предела исключения для подтверждающего анализа использовали значения % ингибирования, рассчитанные для 50 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, проанализированные в формате подтверждающего анализа (с добавлением трастузумаба, 2 мг/мл). Значения % ингибирования проверяли на нормальное распределение (тест Шапиро – Уилка), после чего проводили log-преобразование данных и исключение выбросов по методу Тьюки. После повторной проверки на нормальное распределение (тест Шапиро – Уилка) предел исключения для подтверждающего анализа рассчитывали непараметрическим методом. Для использования в анализе был выбран фиксированный предел исключения для подтверждающего анализа, значение cut-point составило 34,59 %.

### Чувствительность методики

Определение чувствительности методики проводили в ходе 2 циклов, совместно с установлением концентраций образцов положительного контроля (на верхнем и нижнем уровнях – HPC и LPC, соответственно). Анализировали образцы положительного контроля, содержащие антитела к трастузумабу в различных концентрациях (от 25000 нг/мл до 31,25 нг/мл). Каждый цикл включал в себя три серии разведений (стандарты 1–10, таблица 2), образцы положительного контроля (PC-1 – 1000 нг/мл и PC-2 – 500 нг/мл) и образцы отрицательного контроля (NC).

Для определения чувствительности анализа и концентрации LPC были использованы номинальные значения концентрации стандартных образцов, усредненная оптическая плотность которых была выше, чем значение соответствующего PSCP. Значения концентрации (нг/мл) переводили в log-фор-

му, а затем рассчитывали чувствительность методики. Перевод полученного значения в оригинальную шкалу из log-формы позволил получить численное значение чувствительности методики, которое составило 99,5 нг/мл. Параллельно с определением чувствительности были рассчитаны концентрации контрольных образцов. Концентрацию LPC определяли по алгоритму, аналогичному расчету чувствительности методики. Теоретическая концентрация образца LPC составила 128,9 нг/мл. Для удобства и точности приготовления контрольных образцов, практическая концентрация LPC составила 129 нг/мл антител к трастузумабу. Концентрация НРС была выбрана как верхняя точка в линейном диапазоне при построении калибровочной кривой и составила 2580 нг/мл антител к трастузумабу.

**Таблица 2. Концентрации стандартных образцов для определения чувствительности методики**

**Table 2. The concentrations of standard samples during sensitivity runs**

№ стандарта Standard No.	Концентрация антител к трастузумабу, нг/мл Anti-trastuzumab Ab concentration, ng/ml
1	25000
2	10000
3	5000
4	2500
5	100
6	500
7	250
8	100
9	62,5
10	31,25

### «Хук»-эффект

Включение в циклы оценки чувствительности образцов с высокой концентрацией антител к трастузумабу позволило оценить потенциальное наличие «хук»-эффекта в методике. Рассчитанное для всех стандартных образцов значения соотношения «сигнал/шум» (относительно соответствующего PSCP) позволило показать отсутствие «хук»-эффекта, так как не наблюдалось снижения оптической плотности стандартных образцов с увеличением концентрации антител к трастузумабу.

### Селективность

Селективность методики оценивали с использованием 10 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, включая гемолизные и хи-

лезные образцы, с добавлением и без добавления антител к трастузумабу до уровней НРС и LPC. Анализ проводили как в формате скрининга, так и в формате подтверждающего анализа. Селективность методики была подтверждена, так как 100 % индивидуальных образцов (10/10) интактной сыворотки крови человека имели отклик ниже PSCP, а также при этом 100 % образцов положительного контроля (НРС, LPC) были «истинно положительными» по результатам скрининга и подтверждающего анализа.

### Толерантность методики к присутствию лекарственного препарата

Оценка толерантности методики к присутствию интерферирующего биологического препарата в образцах (drug tolerance) – один из ключевых моментов валидации методики оценки иммуногенности. Для оценки толерантности методики к присутствию лекарственного в формате скрининга были проанализированы 25 образцов, содержащие антитела к трастузумабу и сам препарат в различных концентрациях. Была проведена сравнительная оценка для исследуемого препарата и препарата сравнения. Образцы содержащие антитела к трастузумабу и образцы трастузумаба были приготовлены в двукратной концентрации с использованием 100 % биологической матрицы (интактной пулированной сыворотки крови человека), а затем смешивались в соотношении 1:1 для получения образцов для оценки толерантности методики к трастузумабу.

Количественно толерантность методики к лекарственному препарату выражалась максимальной концентрацией препарата, при которой на различных уровнях концентрации антител к трастузумабу сохранялся сигнал выше PSCP. Для данной методики значение толерантности методики к присутствию лекарственного препарата для трастузумаба составило 50 мкг/мл (на уровне 500 нг/мл антител к трастузумабу), для Герцептина® составило 50 мкг/мл (на уровне 1000 нг/мл антител к трастузумабу).

### Прецизионность

Прецизионность методики оценивали как для скрининга, так и для подтверждающего анализа. Для оценки использовали образцы НРС и LPC, которые были проанализированы в ходе 6 циклов, двумя аналитиками, в течение трех дней. Каждый цикл включал в себя по три набора контрольных образцов (НРС, LPC и NC), первый цикл для первого аналитика включал в себя 6 наборов контролей для оценки прецизионности внутри цикла (intra-day). Данные, полученные в ходе всех шести циклов, использовались для оценки прецизионности между циклами (inter-day). Количественно прецизионность методики внутри и между циклами выражалась путем расчета коэф-

фициента вариации (CV, %) для первого цикла и для всех шести циклов, соответственно. Прецизионность для формата скрининга оценивалась с использованием средних значений ОП для образцов положительного контроля (НРС, LPC). Прецизионность для подтверждающего анализа оценивалась с использованием рассчитанных значений % ингибирования сигнала. Полученные результаты приведены в таблице 3 (внутри цикла) и таблице 4 (между циклами).

Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) не превышали 20 %, что соответствует требованиям нормативной документации [14].

### Стабильность

В ходе валидации методики оценивалась: краткосрочная стабильность (образцы положительного контроля перед анализом хранили 24 часа при комнатной температуре, 18–25 °С), стабильность при заморозке-разморозке (3 цикла, каждая заморозка не менее 12 часов при температуре  $-40 \pm 10$  °С), а так-

же долгосрочная стабильность (хранение в условиях низкотемпературной заморозки при температуре  $-40 \pm 10$  °С) в течение 137 дней. Циклы по оценке стабильности помимо исследуемых образцов для оценки стабильности (по 3 набора образцов положительного контроля НРС и LPC для каждого вида стабильности) включал в себя два набора свежеприготовленных образцов положительного контроля – для расчета РSCP и контроля пригодности аналитических циклов. Стабильность образцов оценивали путем расчета коэффициента вариации (CV, %) между тремя наборами образцов для каждого вида стабильности. Образцы были признаны стабильными, так как коэффициенты вариации не превышали 20 %. Полученные результаты приведены в таблице 5.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика полуколичественного определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА.

Таблица 3. Прецизионность внутри цикла

Table 3. Intra-day precision

Образец Sample	Набор образцов положительного контроля № PC samples set No.						Среднее Mean	CV, %
	1	2	3	4	5	6		
Формат анализа: скрининг Screening assay format								
НРС	1,071	1,151	1,401	1,345	1,428	1,176	1,262	11,76
LPC	0,049	0,044	0,054	0,044	0,041	0,047	0,046	9,86
Формат анализа: подтверждающий Confirmatory assay format								
НРС	98,459	98,566	98,858	98,773	98,985	98,682	98,720	0,19
LPC	63,918	59,091	69,159	62,069	60,494	66,667	63,566	6,00

Таблица 4. Прецизионность между циклами

Table 4. Inter-day precision

Скрининг (Цикл №) Screening (Run No.)									
Образец Sample	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	S.D.	CV, %
НРС	1,262	1,055	0,989	1,110	1,097	1,135	1,108	0,091	8,23
LPC	0,046	0,038	0,034	0,040	0,041	0,037	0,039	0,004	10,52
Подтверждающий анализ (Цикл №) Confirmatory assay (Run No.)									
Образец Sample	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	S.D.	CV, %
НРС	98,720	98,502	98,667	98,755	98,566	98,567	98,629	0,099	0,10
LPC	63,566	59,494	64,185	65,123	67,429	61,268	63,511	2,813	4,43

Таблица 5. Рассчитанные для образцов оценки стабильности значения коэффициентов вариации

Table 5. The CV, % values calculated for sample stability assessment

Краткосрочная («насто́льная») стабильность Sample bench-top stability (BTS)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_BTS24	1,360	1,254	0,952	1,188	0,211	17,79
LPC_BTS24	0,038	0,036	0,030	0,034	0,004	12,72
Стабильность при заморозке-разморозке Sample freeze-thaw stability (F/T)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_F/T	1,050	1,195	0,929	1,058	0,133	12,59
LPC_F/T	0,042	0,035	0,030	0,035	0,006	17,00
Долгосрочная стабильность Sample long-term stability (LTS)						
Образец Sample	1	2	3	Среднее Mean	S.D.	CV, %
HPC_LTS	1,262	0,973	1,089	1,108	0,146	13,15
LPC_LTS	0,030	0,035	0,032	0,032	0,003	7,78

Полуколичественное определение проводилось методом ИФА в сочетании с техникой АСЕ и использованием спектрофотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра. Чувствительность методики и концентрация LPC были определены на уровне 99,5 нг/мл и 129 нг/мл антител к трастузумабу, соответственно. Для этапа скрининга был выбран плавающий предел исключения со значением фактора нормализации 0,004, а для этапа подтверждающего анализа фиксированный предел исключения – 34,59 %. Толерантность методики к присутствию исходного биологического препарата была показана вплоть до концентрации 50 мкг/мл (для трастузумаба на уровне 500 нг/мл антител, для Герцептина® на уровне 1000 нг/мл антител). Полученные значения пределов исключения, чувствительности и толерантности методики к лекарственному препарату позволяют применять валидированную методику для проведения аналитической части исследований безопасности препаратов трастузумаба.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kaprin A. D., Starinskij V. V., Shahzadova A. O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Moscow: MNIОI im. P. A. Gercena – filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii; 2021. 252 p.
- Kreutzfeldt J., Rozeboom B., Dey N., De P. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER<sub>2+</sub> breast cancer therapies. *Am J Cancer Res.* 2020;10(4):1045–1067.
- Akbari V., Chou C., Abedi D. New insights into affinity proteins for HER2-targeted therapy: Beyond trastuzumab. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer.* 2020;1874(2):188448. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188448.
- Gonzalez-Conchas G. A., Rodriguez-Romo L., Hernandez-Barajas D., Gonzalez-Guerrero J. F., Rodriguez-Fernandez I. A., Verdines-Perez A., Templeton A. J., Ocana A., Seruga B., Tannock I. F., Amir E., Vera-Badillo F. E. Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis. *Cancer treatment reviews.* 2018;62:1–8. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.10.008.
- Oberg H. H., Janitschke L., Sulaj V., Weimer J., Gonnermann D., Hedemann N., Wesch D. Bispecific antibodies enhance tumor-infiltrating T cell cytotoxicity against autologous HER-2-expressing high-grade ovarian tumors. *Journal of leukocyte biology.* 2020;107(6):1081–1095. DOI: 10.1002/JLB.5MA1119-265R.
- Gaibar M., Beltrán L., Romero-Lorca A., Fernández-Santander A., Novillo A. Somatic mutations in HER2 and implications for current treatment paradigms in HER2-positive breast cancer. *Journal of Oncology.* 2020;2020:1–13. DOI: 10.1155/2020/6375956.
- Tang Z., Jun Ya., Lv Ya., Li Yu., Zhang Z., Tao M., Chen X., He J., Zhang L., Wang Q.-L. Aptamer conjugated and doxorubicin-loaded grapefruit-derived nanovectors for targeted therapy against HER2+ breast cancer. *Journal of Drug Targeting.* 2020;28(2):186–194. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1624970.
- Barbier L., Declerck P., Simoen S., Neven P., Vulto A. G., Huys I. The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *Br J Cancer.* 2019;(121):199–210. DOI: 10.1038/s41416-019-0480-z.
- Sauna Z. E., Lagassé D., Pedras-Vasconcelos J., Golding B., Rosenberg A. S. Evaluating and mitigating the immunogenicity of therapeutic proteins. *Trends in biotechnology.* 2018;36(10):1068–1084. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.05.008.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-128-132](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-128-132)  
УДК 614.272:614.283:615.45:616-039.55



Оригинальная статья / Research article

## Уничтожение наркотических средств и психотропных веществ как этап обращения лекарственных средств

Т. Л. Малкова✉, Е. С. Березина

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

✉ Контактное лицо: Малкова Тамара Леонидовна. E-mail: kaftox1@mail.ru

ORCID: Т. Л. Малкова – <https://orcid.org/0000-0002-5795-0803>; Е. С. Березина – <https://orcid.org/0000-0002-4122-2414>.

Статья поступила: 14.10.2022    Статья принята в печать: 08.12.2022    Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Уничтожение является одним из этапов обращения лекарственных средств. Этому этапу в отношении препаратов, относящихся к наркотическим средствам и психотропным веществам, придается особая значимость. Деятельность аптечных и медицинских организаций в отношении оборота этих средств строго регламентирована.

**Цель.** Целью исследования было изучение процедуры уничтожения наркотических средств и психотропных веществ, включенных в Списки II и III Перечня, как этапа обращения лекарственных средств, выявление тенденций назначения отдельных лекарственных препаратов для обезболивания на основании обобщения архивных данных комиссии по уничтожению, созданной на базе Пермской государственной фармацевтической академии.

**Материалы и методы.** При выполнении работы были использованы архивные материалы комиссии по уничтожению за 2012–2021 гг. В состав каждой архивной папки за определенный месяц года входили следующие документы: приказ о проведении комиссии по уничтожению и приложения, комплект документов и акты уничтожения для каждого учреждения, которое предоставило лекарственные препараты. Использовались статистические и эмпирические методы, такие как наблюдение, описание, изучение, обобщение и группировка, сравнение, доказательство.

**Результаты и обсуждение.** Данные по назначению препаратов онкобольным и данные по сдаваемым на уничтожение препаратам коррелируют. Поэтому, ассортимент и количество передаваемых на уничтожение медицинскими учреждениями лекарственных препаратов позволяет увидеть тенденции в назначении и использовании их в медицинской практике.

**Заключение.** Оптимизация деятельности, связанной с оборотом контролируемых веществ, может быть обеспечена построением четкого алгоритма действий в медицинской организации по каждому виду работ и услуг, указанному в лицензии, в том числе и по виду работ – уничтожение. Процедура уничтожения наркотических и психотропных лекарственных препаратов, которая сопровождается проверкой на заседаниях комиссии сопроводительных документов и объектов, позволяет осуществить контроль по использованию и учету препаратов в медицинских учреждениях.

**Ключевые слова:** уничтожение, наркотические средства, психотропные вещества, обращение лекарственных средств

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

**Вклад авторов.** Т. Л. Малкова и Е. С. Березина провели выборку, обработку и группировку архивных данных, выявили тенденции использования в медицинской практике контролируемых лекарственных препаратов. Оба автора участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Для цитирования:** Малкова Т. Л., Березина Е. С. Уничтожение наркотических средств и психотропных веществ как этап обращения лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(4–1):128–132. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-128-132](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-128-132)

## Destruction of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances as a Stage of Circulation of Medicines

Tamara L. Malkova✉, Elena S. Berezina

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

✉ Corresponding author: Tamara L. Malkova. E-mail: kaftox1@mail.ru

ORCID: Tamara L. Malkova – <https://orcid.org/0000-0002-5795-0803>; Elena S. Berezina – <https://orcid.org/0000-0002-4122-2414>.

Received: 14.10.2022    Revised: 08.12.2022    Published: 27.12.2022

### Abstract

**Introduction.** Destruction is one of the stages of the circulation of medicines. Special importance is attached to this stage in relation to drugs related to narcotic drugs and psychotropic substances. The activities of pharmacy and medical organizations in relation to the turnover of these funds are strictly regulated.

© Малкова Т. Л., Березина Е. С., 2022

© Malkova T. L., Berezina E. S., 2022

**Aim.** The purpose of the study was to study the procedure for the destruction of narcotic drugs and psychotropic substances included in Lists II and III of the List, as a stage of the circulation of medicines, to identify trends in the appointment of individual drugs for pain relief based on the generalization of archival data of the commission on destruction established on the basis of the Perm State Pharmaceutical Academy.

**Materials and methods.** Archival materials of the destruction commission for 2012–2021 were used in the execution of the work. Each archive folder for a certain month of the year included the following documents: an order for the commission on destruction and appendices, a set of documents and acts of destruction for each institution that provided medicines. Statistical and empirical methods were used, such as observation, description, study, generalization and grouping, comparison, proof. Results and discussion. Data on prescribing drugs to cancer patients and data on drugs submitted for destruction correlate. Therefore, the range and quantity of medicines transferred for destruction by medical institutions allows us to see trends in their appointment and use in medical practice.

**Conclusion.** Optimization of activities related to the turnover of controlled substances can be ensured by building a clear algorithm of actions in a medical organization for each type of work and services specified in the license, including the type of work – destruction. The procedure for the destruction of narcotic and psychotropic drugs, which is accompanied by verification of accompanying documents and objects at the meetings of the commission, allows monitoring the use and accounting of drugs in medical institutions.

**Keywords:** destruction, narcotic drugs, psychotropic substances, circulation of medicines

**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.** Tamara L. Malkova and Elena S. Berezina conducted sampling, processing and grouping of archival data, identified trends in the use of controlled drugs in medical practice. Both authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Malkova T. L., Berezina E. S. Destruction of narcotic drugs and psychotropic substances as a stage of circulation of medicines. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):128–132. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-128-132](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-128-132)

## ВВЕДЕНИЕ

Проблемы, связанные с распространением наркомании и ростом наркопреступности, сегодня представляют реальную угрозу национальной безопасности России, здоровью нации и социальной стабильности в обществе [2, 4, 6]. Включение тех или иных веществ в соответствующие списки является правовым актом, который выполняется в соответствии с требованиями международного и национального права [9, 11, 12]. Следует отметить, что во всем мире существует ряд наркотических и психотропных средств, а также сильнодействующих и ядовитых веществ, которые официально разрешены для использования в медицинских целях. Это значит, что их можно законно производить, хранить, распределять, ввозить и вывозить из страны<sup>1</sup>.

Обеспечение высокого уровня оказания лекарственной помощи, ее эффективность, непосредственно влияет на качество медицинской помощи в целом [7, 8, 10]. Безусловно, огромная роль здесь принадлежит анальгезирующим эффектам наркотических средств (НС) и психотропных веществ (ПВ). Однако помимо данного положительного свойства эти вещества обладают и отрицательными эффектами, а именно – эйфорией, привыканием, приводящим к наркотической зависимости [1, 5, 13].

<sup>1</sup> О наркотических средствах и психотропных веществах. Федеральный закон от 08.01.1998 № 3-ФЗ. Доступно по: <https://base.garant.ru/12107402/> Ссылка активна на 21.10.2022.

Процедура уничтожения контролируемых групп веществ составляет один из этапов обращения лекарственных средств и имеет важное значение для обеспечения соблюдения требований по приобретению, хранению и использованию НС и ПВ, находящихся в легальном обороте<sup>2</sup> [3]. В настоящее время действует новый нормативный документ, определяющий эту процедуру – приказ МЗ РФ от 22 октября 2021 г. № 1004н<sup>3</sup>.

В Пермской государственной фармацевтической академии с 2005 года на базе Регионального испытательного центра «Фарматест» работает краевая комиссия по уничтожению НС и ПВ, дальнейшее использование которых в медицинской практике признано нерациональным. За этот период накоплен большой опыт взаимодействия с медицинскими учреждениями, собран архивный материал по результатам ежемесячных заседаний комиссии, проработаны методические подходы к процедуре уничтожения, обобщены недостатки в деятельности отдельных учреждений.

<sup>2</sup> Об обращении лекарственных средств. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ. Доступно по: <https://base.garant.ru/12174909/> Ссылка активна на 21.10.2022.

<sup>3</sup> Об утверждении инструкции по уничтожению наркотических средств и психотропных веществ, входящих в списки и перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации, дальнейшее использование которых в медицинской практике признано нецелесообразным. Приказ МЗ РФ от 22.10.2021 № 1004н. Доступно по: <https://base.garant.ru/403136773/> Ссылка активна на 21.10.2022.

**Цель работы** заключается в изучении процедуры уничтожения НС и ПВ, включенных в Списки II и III Перечня<sup>1</sup>, как этапа обращения лекарственных средств, выявление тенденций назначения отдельных лекарственных препаратов для обезболивания на основании обобщения архивных данных Пермской краевой комиссии по уничтожению.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объекты исследования

При проведении исследования были использованы архивы Пермской краевой комиссии по уничтожению НС и ПВ по субъектам и объектам уничтожения лекарственных препаратов, включенных в Списки II и III Перечня, за период 2012–2021 гг. Изучены приказы академии по уничтожению, приложения к ним, акты уничтожения, а также все сопроводительные документы, предоставляемые учреждениями, вместе с объектами уничтожения. Материалы распределены по юридическим лицам (медицинские и аптечные учреждения Пермского края), наименованию препаратов, форме выпуска, дозировке, причине уничтожения.

### Используемые методы

При выполнении работы были использованы статистические и эмпирические методы: наблюдение, описание, изучение, обобщение и группировка, сравнение, доказательство и другие. Все этапы нашего исследования включали те или иные процедуры наблюдения за отдельными сторонами уничтожения лекарственных препаратов, изучение общего протекания процесса, отдельных его деталей, выявления недостатков и анализа рисков, выделение и закрепление часто повторяющихся, устойчивых свойств, отношений, обобщение и систематизация данных по всем объектам уничтожения с учетом наименований, дозировки, лекарственных форм, причин уничтожения, с учетом временного интервала проведения исследования по годам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения работы было выявлено, что наиболее часто назначаемыми препаратами из Списка II Перечня для обезболивания были морфин в ампулах (38145 штук) и таблетках (9893 штуки), а также трансдермальные терапевтические системы (ТТС) с фентанилом (4725 штук). Лекарственные препараты морфина в виде таблеток начали активно применяться с 2016 года.

<sup>1</sup> Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации. Постановление Правительства РФ от 30.06.1998 № 681. Доступно по: <https://base.garant.ru/12112176/> Ссылка активна на 21.10.2022.

С 2019 года на заседаниях комиссии стали рассматриваться дела по уничтожению таблеток Таргин®, содержащих оксикодон (2340 таблеток за 3 года), что свидетельствует об увеличении их использования в медицинской практике.

Инъекционные растворы, содержащие «Омнопон», с 2017 года стали редко выписываться больным и не сдавались их родственниками в медицинские учреждения, а, значит, и не попадали в качестве объектов на уничтожение.

«Промедол» в форме ампульных растворов применяется в медицинской практике регулярно, однако в связи с использованием для обезболивания и других лекарственных препаратов (таблеток, трансдермальных терапевтических систем) за последние 6 лет количество промедола в обороте снизилось. Шприц-тюбики с промедолом, наоборот, с 2015 года активно используются в аптечке военнослужащих, отправляющихся в «горячие точки». Поэтому, ежегодно препарат попадает в комиссию по уничтожению и уничтожается в соответствии с действующим законодательством.

Архивные данные показали, что в течение всего исследуемого периода в медицинской практике применялись трансдермальные терапевтические системы с контролируемой скоростью высвобождения вещества. С 2012 по 2019 год преобладали импортные лекарственные препараты в форме ТТС. Однако с 2020 года активно в медицинской практике стали применяться отечественные пластыри «Фентанил». Использование импортных ТТС «Дюрогезик» практически сошло на нет.

Инъекционные растворы **кетамина** ежегодно передавались медицинскими учреждениями на уничтожение (всего 4995 единицы). Отмечена тенденция к снижению количества уничтоженных ампул в целом и объема оставшегося в ампулах раствора.

В ходе проведения исследований выявлено, что наиболее часто назначаемыми препаратами Списка III Перечня были диазепам (105,95 г), фенобарбитал (1857,32 г), натрия оксibuтират (95,14 г), данные даны в граммах из расчета содержания действующих веществ. При этом все эти препараты в различных лекарственных формах уничтожались регулярно, данные имеются за каждый год периода.

Была, однако, замечена тенденция снижения количества вскрытых не полностью использованных ампул диазепам (диазепам, релиум, седуксен, сибазон, реланиум) от начала до конца исследуемого периода: практически в 20 раз. Частично, это связано с тем, что в феврале 2013 года Список III Перечня НС и ПВ значительно расширился, большое количество антидепрессантов, транквилизаторов оказались контролируруемыми. С другой стороны, многие из этих препаратов, имеющиеся на балансе медицинских учреждений, не были востребованы в медицинской практике и уничтожались по причине истечения срока год-

ности, например, с 2016 по 2019 годы было уничтожено 39 400 таблеток «Алпразолам».

Уничтожение многих психотропных препаратов в таблетированной форме было эпизодическим. Больше всего препаратов было уничтожено из тех, которые содержали в качестве действующего вещества хлордиазепоксид и оксазепам. В течение многих лет периода регулярно уничтожались препараты, содержащие клоназепам, нитразепам, оксазепам. Однако за последние 3 года ни один из этих препаратов, кроме клоназепама, не сдавался ЛПУ на уничтожение.

Интересна тенденция использования лекарственных препаратов фенобарбитала: порошки с 2014 года не передавались в комиссию по уничтожению, что свидетельствует об ограничении их применения в медицинской практике, таблетки же фенобарбитала в период с 2014 по 2018 годы широко использовались и, как следствие, становились объектами уничтожения.

На следующем этапе мы изучили причины, которые привели к необходимости уничтожения конкретных наименований лекарственных препаратов, на основании которых они не могли в дальнейшем использоваться в медицинской практике. По каждому наименованию препарата мы обобщили эти причины.

Анализ данных за исследуемый период показал, что основной причиной уничтожения лекарственных препаратов Списка II Перечня является передача родственниками умерших онкобольных. Для препаратов морфина эта цифра составила 93,7 %, для раствора омнопона, таблеток «Таргин», «Просидол» – 100 %, для раствора промедола – 64,6 %, для ТТС с фентанилом – 98,6 %.

Наибольшее число единиц лекарственных препаратов, уничтоженных по причине истечения срока годности, а, значит, не востребованности в медицинской практике, дал ампульный раствор фентанила – 97,1 %.

«Кетамин» широко применяется в детской практике, о чем свидетельствует сдаваемое на уничтожение большое количество не полностью использованных ампул, когда только часть ампулы расходуется в соответствии с весом ребенка. Остатки раствора вместе с ампулой сдаются на уничтожение. Доля кетамина среди всех уничтоженных по причине механического воздействия препаратов (вскрытые не полностью использованные ампулы) составила 85,6 %.

В качестве других причин уничтожения были выявлены: прекращение действия лицензии у лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ), ликвидация подразделения ЛПУ, реорганизация ЛПУ, бой ампул, хранение с нарушением температурного режима. Последняя причина наиболее часто связана с использованием шприц-тюбиков с промедолом в период армейских учений или военных операций. Так как обеспечить требуемый режим хранения в эти периоды невозможно, по возвращении военнослужа-

щих на базу, препарат подлежит уничтожению в соответствии с действующим законодательством.

Анализ данных за исследуемый период показал, что основными причинами уничтожения лекарственных препаратов Списка III Перечня является истечение срока годности и механическое воздействие (вскрытые не полностью использованные ампулы). В этом основное отличие причин уничтожения от препаратов Списка II, где основной причиной является передача препаратов родственниками умерших онкобольных.

Причины уничтожения, связанные с истечением срока годности и механическим воздействием, можно отнести только к диазепаму, мидазолему и натрию оксibuтирату, которые выпускаются, в том числе, в виде инъекционных растворов. У подавляющего большинства препаратов в таблетированной форме основной причиной уничтожения было истечение срока годности (тианептин, золпидем, нитразепам, ме-пробамат, оксазепам, хлордиазепоксид, медазепам).

К другим редким причинам уничтожения препаратов Списка III можно отнести сдачу родственниками онкобольных, бой, реорганизация подразделений ЛПУ, нереализованные остатки в связи с закрытием ЛПУ, отсутствием лицензии, невыясненные условия хранения или их нарушение, непригодность ЛС ввиду воздействия на него.

При изучении протоколов комиссии по уничтожению, а также информационных писем, которые рассылаются по итогам проведения заседаний комиссии в ЛПУ Пермского края, выявлен ряд ошибок, допускаемых этими медицинскими учреждениями при оформлении документации и подготовке объектов к уничтожению.

Основными группами таких нарушений являются следующие: некорректное оформление сопроводительных документов (заявителем не указываются или указываются с ошибками наименование препарата, в том числе международное непатентованное, серия, срок годности, дата производства для импортных препаратов, дата сдачи родственниками онкобольных, дозировка, объем), отсутствие необходимых документов в комплекте (акта о порче в случае истечения срока годности, упаковочного вкладыша непосредственно в упаковке), нарушение сроков сдачи препаратов комиссию по уничтожению, несоответствие фактического наличия единиц препарата заявленному в сопроводительных документах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые систематизированы и обобщены данные за 2012–2021 гг. по уничтожению НС и ПВ, включенных в Списки II и III Перечня НС и ПВ, произведенному Пермской краевой комиссией по уничтожению, созданной на базе ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Изучен ассортимент и количество передаваемых на уничтожение медицинскими учреждениями лекарственных препаратов, что позволило увидеть тен-

денции в назначении и использовании их в медицинской практике. Полученные результаты научного исследования переданы в Министерство здравоохранения Пермского края.

Результатом работы с замечаниями в адрес отдельных юридических лиц является оформление информационных писем, составленных в обобщенном виде, и рассылка их во все медицинские учреждения Пермского края. Это позволяет оптимизировать организационные аспекты деятельности этих учреждений, связанные с оборотом НС и ПВ, оказывать помощь в построении четкого алгоритма действий каждого из этапов, в том числе этапа уничтожения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов А. Ю., Косолапова Н. В., Тхай С. В. Правовые признаки наркотических средств и психотропных веществ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2014;9(1):108–112. DOI: 10.14300/mnnc.2014.09031.
2. Бабанин А. А., Уланов В. С. Анализ смертельных отравлений психоактивными веществами в Республике Крым за 1993–2017 гг. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(5):54–57. DOI: 10.17116/sudmed20196205154.
3. Баранов Д. Е., Кононова С. В., Чеснокова Н. Н. Особенности организации уничтожения наркотических средств и психотропных веществ медицинскими организациями в условиях изменения нормативного регулирования в сфере оборота наркотических средств и психотропных веществ. *Медицинский альманах*. 2017;2(47):127–132.
4. Владимиров В. Ю., Ковалев А. В., Минаева П. В., Самоходская О. В. Смертельные отравления наркотическими средствами и психотропными веществами в России (по материалам 2003–2018 гг.). *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(5):4–8. DOI: 10.17116/sudmed2019620514.
5. Голенков А. В. Потенциальные риски при использовании опиоидов у пациентов с хронической болью. *Российский журнал боли*. 2022;20(5):110–111. DOI: 10.17116/pain2022200325.
6. Долгова О. Б., Грехов И. А. Прогностические критерии судебно-медицинской диагностики острых отравлений наркотиками на этапе исследования трупа. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2020;63(4):22–26. DOI: 10.17116/sudmed20206304122.
7. Кактурский Л. В., Зайратьянц О. В. Клинико-анатомические сопоставления в оценке качества медицинской помощи. *Судебная медицина*. 2019;2(5):4–10. DOI: 10.19048/2411-8729-2019-5-2-4-10.
8. Клименкова А. А., Геллер Л. Н., Скрипка А. А., Гравченко Л. А., Коржавых Э. А. Фармацевтические услуги: состояние и тенденции развития. *Фармация и фармакология*. 2021;9(1):32–53. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-32-53.
9. Лемешко В. А., Матренин К. И., Омельяновский В. В., Васильева Ю. В., Хачатрян Г. Р., Колганов Л. А. Разработка методики сравнительного анализа номенклатуры перечней лекарственных препаратов и ее применение для анализа перечней России, Англии и Италии. *Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология*. 2021;14(1):5–15. DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2021.072.
10. Никитина А. В., Горкавенко Ф. В., Сайбель Е. С., Авксентьева М. В., Сура М. В., Федяев Д. В. Оптимизация лекарственного обеспечения пациентов со злокачественными новообразованиями на уровне субъекта Российской Федерации. *Фармакоэкономика. Современная Фармакоэкономика и Фармакоэпидемиология*. 2019;12(4):300–308. DOI: 10.17749/2070-4909.2019.12.4.300-308.
11. Николаева Н. М. Совершенствование законодательства в сфере оборота наркотических средств и психотропных веществ. *Правовые вопросы в здравоохранении*. 2016;2;14–26.
12. Ризванова Л. Н., Апполонова С. А., Савчук С. А., Жевелик О. Д. Сравнение процедур пробоподготовки при химико-токсикологическом исследовании мочи на наличие наркотиче-

ских средств, психотропных веществ и их метаболитов. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(4):42–46. DOI: 10.17116/sudmed20196204142.

13. Чистова Л. Е. Формы взаимодействия следователя и специалиста в области судебной медицины при расследовании преступлений, связанных с незаконным оборотом наркотических средств. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(6):23–26. DOI: 10.17116/sudmed20196206123.

## REFERENCES

1. Abramov A. Yu., Kosolapova N. V., Thai S. V. Legal signs of narcotic drugs and psychotropic substances. *Medical Bulletin of the North Caucasus*. 2014;9(1):108–112. (In Russ.) DOI: 10.14300/mnnc.2014.09031.
2. Babanin A. A., Ulanov V. S. Analysis of fatal cases of psychoactive drug overdoses in the Crimean Republic between 1993–2017. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa*. 2019;62(5):54–57. (In Russ.) DOI: 10.17116/sudmed20196205154.
3. Baranov D. E., Kononova S. V., Chesnokova N. N. Features of the organization of the destruction of narcotic drugs and psychotropic substances by medical organizations in the context of changes in regulatory regulation in the sphere of turnover of narcotic drugs and psychotropic substances. *Medical almanac*. 2017;2(47):127–132. (In Russ.)
4. Vladimirov V. Yu, Kovalev A. V, Minaeva P. V., Samokhodskaya O. V. Overdose deaths from narcotic drugs and psychotropic substances in Russia (an analysis of materials for the period 2003 to 2018). *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa*. 2019;62(5):4–8. (In Russ.) DOI: https://doi.org/10.17116/sudmed2019620514.
5. Golenkov A. V. Potential risks when using opioids in patients with chronic pain. *Russian journal of pain*. 2022;20(5):110–111. (In Russ.) DOI: 10.17116/pain2022200325.
6. Dolgova O. B, Grekhov I. A. Prognostic criteria for the forensic diagnosis of acute drug poisoning at the stage of study of corpse. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa*. 2020;63(4):22–26. (In Russ.) DOI: 10.17116/sudmed20206304122.
7. Kaktursky L. V., Zayratyants O. V. Clinical and anatomical comparisons in assessing the quality of medical care. *Forensic Medicine*. 2019;2(5):4–10. (In Russ.) DOI: 10.19048/2411-8729-2019-5-2-4-10.
8. Klimenkova A. A., Geller L. N., Skripko A. A., Gravchenko L. A., Korzhavykh E. A. Pharmaceutical services: status and development trends. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(1):32–53. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-32-53.
9. Lemeshko V. A., Matrenin K. I., Omelyanovskiy V. V., Vasilyeva Yu. V., Khachatryan G. R., Kolganov L. A. Development of a method for the analysis of the lists of medicines and its application for the analysis of the lists of medicines in Russia, England, and Italy. *Farmakoeconomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2021;14(1):5–15. (In Russ.) DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2021.072.
10. Nikitina A. V., Gorkavenko F. V., Saybel Y. S., Avxentyeva M. V., Sura M. S., Fedyaev D. V. Optimization of drug supply for patients with malignant neoplasms in a region of the Russian Federation. *Farmakoeconomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2019;12(4):300–308. (In Russ.) DOI: 10.17749/2070-4909.2019.12.4.300-308.
11. Nikolaeva N. M. Improvement of legislation in the sphere of turnover of narcotic drugs and psychotropic substances. *Legal issues in healthcare*. 2016;2;14–26. (In Russ.)
12. Rizvanova L. N., Appolonova S. A., Savchuk S. A., Zhevelik O. D. Comparison of sample preparation techniques in chemical-toxicological analysis of urine for the presence of narcotic drugs, psychotropic substances and their metabolites. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa*. 2019;62(4):42–46. (In Russ.) DOI: 10.17116/sudmed20196204142.
13. Chistova L. E. Forms of interaction between the legal investigator and forensic medical expert in drug crime investigation. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertisa*. 2019;62(6):23–26. (In Russ.) DOI: 10.17116/sudmed20196206123.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-133-138](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-133-138)  
УДК 347.77:614.2:615.07:615.1



Оригинальная статья / Research article

## К вопросу эффективности работы отдела по регистрации лекарственных препаратов

А. В. Фотеева<sup>1,2</sup>, Н. А. Конева<sup>1</sup>, Н. Б. Ростова<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup> ООО «Парма Клиникал», 614113, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Причальная, зд. 16

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

✉ Контактное лицо: Ростова Наталья Борисовна. E-mail: n-rostova@mail.ru

ORCID: А. В. Фотеева – <https://orcid.org/0000-0002-3752-7848>; Н. А. Конева – <https://orcid.org/0000-0001-8164-6521>;  
Н. Б. Ростова – <http://orcid.org/0000-0001-5579-394X>.

Статья поступила: 14.10.2022      Статья принята в печать: 30.11.2022      Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Новые требования к регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов (ЛП) после вступления Российской Федерации (РФ) в Евразийский Экономический союз (ЕАЭС) и подписания Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных препаратов, определили ряд проблем и возможностей, с которыми столкнулись специалисты по регистрации ЛП и работе с регуляторными органами. Представленные перспективы по регистрации ЛП определяют перечень задач к реорганизации работы отдела по работе с регуляторными органами и необходимость повышения компетенции сотрудников организации-производителя с целью осуществления эффективной работы.

**Цель.** Установление критических процессов на этапе подготовки регистрационного досье и регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов для определения направлений повышения эффективности и организации работы отдела по регистрации ЛП.

**Материалы и методы.** В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах по тематическим запросам, составленным по ключевым словам выбранной тематики, официальные интернет-сайты, нормативные-правовые акты (НПА), регламентирующие порядок регистрации ЛС в РФ, ЕАЭС и зарубежных странах.

**Результаты и обсуждение.** Представлен кратко обзор регуляторных вопросов по регистрации ЛП по требованиям Евразийского Экономического союза. Были определены критические этапы процесса регистрации ЛП и задачи, требующих решения с целью обеспечения эффективной работы отдела по работе с регуляторными органами при осуществлении процессов регистрации ЛП на территории РФ, ЕАЭС и других странах. Обозначена роль профессиональной квалификации специалистов, занимающихся вопросами подготовки регистрационного досье и процессами регистрации лекарственных препаратов.

**Заключение.** Изменения нормативно-правового регулирования процесса регистрации и несовершенства требований к специалистам, осуществляющим процедуры подготовки регистрационного досье, определяют необходимость разработки организационных технологий и мероприятий на уровне организации, направленных на стандартизацию всех процессов и формированию профессиональных специализированных компетенций персонала.

**Ключевые слова:** процесс регистрации лекарственных препаратов, воспроизведенные лекарственные препараты, специалист по регистрации, регистрационное досье

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

**Вклад авторов.** Авторы совместно продумывали концепцию статьи, проводили поиск и сбор фактического материала в доступных публикациях в рецензируемых журналах, официальных интернет-сайтах, нормативно-законодательных актах, готовили текст статьи и оформляли его в соответствии с общемедицинским профилем журнала. А. В. Фотеева проверяла статью. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Для цитирования:** Фотеева А. В., Конева Н. А., Ростова Н. Б. К вопросу эффективности работы отдела по регистрации лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):133–138. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-133-138](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-133-138)

## On the Issue of the Effectiveness of the Department for Registration of Medicines

Alexandra V. Foteeva<sup>1,2</sup>, Nataliia A. Koneva<sup>1</sup>, Natalya B. Rostova<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup> LLC "Parma Clinical", bld. 1b, Prichal'naya str., Perm, Perm Territory, 614113, Russia

<sup>2</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

✉ Corresponding author: Natalya B. Rostova. E-mail: n-rostova@mail.ru

ORCID: Alexandra V. Foteeva – <https://orcid.org/0000-0002-3752-7848>; Nataliia A. Koneva – <https://orcid.org/0000-0001-8164-6521>;  
Natalya B. Rostova – <http://orcid.org/0000-0001-5579-394X>.

Received: 14.10.2022      Revised: 30.11.2022      Published: 27.12.2022

© Фотеева А. В., Конева Н. А., Ростова Н. Б., 2022

© Foteeva A. V., Koneva N. A., Rostova N. B., 2022

## Abstract

**Introduction.** New requirements for the registration of generic drugs after the entry of the Russian Federation into the Eurasian Economic Union (EAEU) and the signing of the Agreement on Common Principles and Rules for the Circulation of Medicinal Products identified a number of problems and opportunities that specialists in drug registration and working with regulatory authorities. The presented prospects for drug registration predetermine the list of tasks for the reorganization of the work of the department for work with regulatory authorities and the need to improve the competence of the employees of the manufacturers in order to carry out effective work.

**Aim.** Assessing critical steps in the generic drug registration process to improve the efficiency and organization of the Regulatory Affairs department.

**Materials and methods.** The materials of the study were available publications in peer-reviewed journals on thematic queries compiled according to the keywords of the chosen subject, official websites, regulatory legal acts regulating the procedure for registering drugs in the Russian Federation, the EAEU and foreign countries.

**Results and discussion.** A brief overview of regulatory issues on drug registration according to the requirements of the Eurasian Economic Union is presented. The critical stages of the drug registration process and the tasks that need to be solved in order to ensure the effective work of the department for working with regulatory authorities in the implementation of drug registration processes in the Russian Federation, the EAEU and other countries were identified. The role of professional qualifications of specialists involved in the preparation of the registration dossier and the processes of registration of medicines is indicated.

**Conclusion.** Changes in the legal regulation of the registration process and the imperfection of the requirements for specialists who carry out the procedures for preparing the registration dossier determine the need to develop organizational technologies and measures at the organization level aimed at standardizing all processes and forming professional specialized competencies of personnel.

**Keywords:** registration process of medicines, generic drugs, registration specialist, registration dossier

**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.** The authors jointly thought out the concept of the article, searched for and collected factual material in available publications in peer-reviewed journals, official Internet sites, regulatory and legislative acts, wrote the text of the article and designed it by the general medical profile of the journal. A.V.Foteeva checked the article. All the authors participated in the discussion of the results.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Foteeva A. V., Koneva N. A., Rostova N. B. On the issue of the effectiveness of the department for registration of medicines. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):133–138. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-133-138](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-133-138)

## ВВЕДЕНИЕ

Новые требования к регистрации лекарственных препаратов (ЛП) после вступления Российской Федерации (РФ) в Евразийский Экономический союз (ЕАЭС) и подписания Соглашения о единых принципах и правилах обращения ЛП, определили ряд проблем и возможностей, с которыми столкнулись специалисты по регистрации. Данные изменения предопределяют перечень новых задач к функционированию отдела по работе с регуляторными органами и необходимость повышения компетенции сотрудников организации-производителя с целью осуществления эффективной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах по тематическим запросам, составленным по ключевым словам выбранной тематики, официальные интернет-сайты, нормативные-правовые акты (НПА), регламентирующие порядок регистрации ЛС в РФ, ЕАЭС и зарубежных странах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Новый формат регистрации воспроизведенных ЛП на территории Российской Федерации на сегодняшний день регулируется наднациональными нормативно-правовыми актами Евразийского экономического союза (далее – государства-члены, Союз) пяти стран (Российская Федерация, Республика Армения, Республика Беларусь, Кыргызская Республика, Республика Казахстан)<sup>1</sup> [1, 2]. Одним из основных документов является Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (далее – Правила). В Правилах установлены основные процессы регистрации ЛП, подтверждение регистрации (перерегистрация), внесение изменений в регистрационное досье и иные связанные с регистрацией ЛП для медицинского применения процедуры [3].

<sup>1</sup> Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза Доступно по: [https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0147061/itia\\_24122014](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0147061/itia_24122014) Ссылка активна на 20.10.2022.

За период с 2018 года по 2022 год в Правила были внесены 7 изменений. Все вносимые изменения в Правила подлежат обязательной имплементации Министерством Здравоохранения Российской Федерации совместно с регуляторными органами других государств-членов Союза [4]. Одно из последних изменений Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 17 марта 2022 г. № 36 «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (далее – Решение № 36) дает возможность подготовки и представление регистрационного досье в полностью электронном формате, включая Модуль 1 с использованием электронной подписи ряда документов, что ранее не было доступно. Внесены изменения в сроки проведения регистрации ЛП, а именно сроки представлены в рабочих днях, что дает возможность уполномоченному органу (УО) осуществлять своевременно экспертизу [5]. Для Заявителя учет экспертизы в рабочих днях также дает преимущество, а именно при ответе на запрос УО срок предоставления увеличивается. Согласно Решению № 36, также описаны детализированные требования к регистрации ЛП в исключительных случаях (процессуальные особенности подробно описаны в Приложении № 25 к Правилам), условная регистрация ЛП (Приложение № 26 к Правилам), ускоренная экспертиза ЛП (Приложение № 27 к Правилам). Данные виды регистрации предоставляют возможность для организации-производителя регистрировать орфанные ЛП, лекарственные препараты, предназначенные для лечения, диагностики и профилактики тяжелых (инвалидизирующих) заболеваний и т. д. При условной регистрации предоставляется возможность подачи регистрационного досье с неполными данными об эффективности и безопасности ЛП [6].

В изменениях к Правилам также уточнены условия получения бессрочного удостоверения. Это касается тех случаев, когда ЛП уже зарегистрирован на территории государств-членов ЕАЭС не менее пяти лет, за исключением случаев расширения географии. При включении стран признания, в которых ранее не было регистрации, предусмотрена замена бессрочного регистрационного удостоверения на срочное (сроком на 5 лет) [5].

Внесение изменений в регистрационное досье, подтверждение государственной регистрации (перерегистрации) для ЛП, зарегистрированных по национальной процедуре, продолжает регулироваться Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ (в редакции от 26.03.2022 года) и требует подготовки регистрационного досье в соответствии с национальными требованиями РФ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ Доступно по: <http://www.consultant.ru/> Ссылка активна на 20.10.2022.

Правилами также установлен исчерпывающий перечень документов, которые необходимо в обязательном порядке представить в уполномоченный орган в соответствующем формате. Детализация комплекта документов, а именно представление документов на бумажном и (или) электронном носителе должна быть одинаковой, степень такой детализации определяется и поддерживается заявителем (держателем регистрационного удостоверения). Заявитель представляет в уполномоченный орган референтного государства регистрационное досье в электронном формате XML (R.022) в соответствии с приложениями № 1–5 к Правилам регистрации<sup>2</sup> [7] (таблица 1).

Ответственность при подготовке материалов регистрационного досье в данном формате лежит на специалисте по регистрации [8]. При некорректной загрузке файлов в формате XML, возникают сложности с валидностью комплекта документов регистрационного досье на ЛП.

Для оценки эффективности деятельности отдела по работе с регуляторными органами, можно выделить две группы критических этапов в процессе подготовки регистрационного досье и регистрации ЛП, которые могут оказать значительное негативное влияние на результат подачи пакета документов регистрационного досье в уполномоченный орган (таблица 2).

Эффективное функционирование отдела по работе с регуляторными органами зависит от ряда факторов, в том числе от профессиональной квалификации специалистов. Процессы подготовки регистрационного досье и регистрации ЛП являются комплексными и разнонаправленными, требуют специальных навыков и умений специалиста, сформированных на знаниях:

- формата документов регистрационного досье;
- структуры и содержания материалов регистрационного досье в части аспектов фармацевтической разработки (аналитические методики, технологические подходы, обзоры доклинических исследований и др.);
- иных сопроводительных документов этапа фармацевтической разработки ЛП.

Кроме этого, специалист по регистрации (при наличии соответствующей квалификации) может быть также ответственен за подготовку обобщенного документа регистрационного досье – общего резюме по качеству (ОРК), формируемый на основе информации Модуля 3. Качество регистрационного досье на ЛП, и представляемый в виде краткого резюме с обобщенными данными по качеству ЛП и активной фармацевтической субстанции.

<sup>2</sup> Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 "О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения" Доступно по: <http://www.eurasiancommission.org/> Ссылка активна на 20.10.2022.

**Таблица 1. Процедуры регистрации, возможные результаты и документы, выданные уполномоченным органом, завершающие процесс**

**Table 1. Registration procedures, possible outcomes and documents issued by the authorized body that complete the process**

№ п/п No. p/p	Процедура Procedure	Результат Result	
		Положительный Positive	Отрицательный (отказ) Negative (rejection)
1	Регистрация ЛП LP registration	Регистрационное удостоверение (РУ), нормативная документация по качеству, макеты, общая характеристика лекарственного препарата (ОХЛП), листок-вкладыш (ЛВ) Marketing Authorization (MA), regulatory documentation on quality, layouts, general characteristics of the medicinal product (SmPC), package leaflet (PL)	Отрицательный экспертный отчет по оценке ЛП Negative expert report on the evaluation of drugs
2	Подтверждение регистрации (перерегистрация) Registration confirmation (re-registration)	РУ RU	Отрицательный экспертный отчет по оценке ЛП Negative expert report on the evaluation of drugs
3	Внесение изменений в регистрационное досье Making changes to the registration dossier	В зависимости от вносимых изменений РУ, нормативная документация по качеству, макеты, ОХЛП, ЛВ. По запросу заявителя возможно предоставление экспертного отчета (при необходимости) Depending on the changes made, RC, regulatory quality documentation, layouts, SmPC, PL. At the request of the applicant, it is possible to provide an expert report (if necessary)	Отрицательный экспертный отчет по оценке ЛП Negative expert report on the evaluation of drugs
4	Приведение в соответствие с требованиями ЕАЭС Bringing into compliance with the requirements of the EAEU	РУ, нормативная документация по качеству, макеты, ОХЛП, ЛВ. По запросу заявителя возможно предоставление экспертного отчета (при необходимости) RU, regulatory documentation for quality, layouts, SmPC, PL. At the request of the applicant, it is possible to provide an expert report (if necessary)	Отрицательный экспертный отчет по оценке ЛП Negative expert report on the evaluation of drugs

**Таблица 2. Критические процессы подготовки регистрационного досье и регистрации лекарственных препаратов**

**Table 2. Critical processes for preparation of a registration dossier and registration of medicinal products**

Документальная часть Documentary	Техническая часть Technical part
Оформление документов регистрационного досье в соответствии с требованиями Решений ЕАЭС Preparation of registration dossier documents in accordance with the requirements of the EAEU Decisions	Оформление документов регистрационного досье в формате 12.pdf (для Модулей 2–5 текст документа должен иметь возможность копирования (читаема подложка)). Загрузка документов регистрационного досье в соответствии с Классификатором <sup>1</sup> в программе с возможностью преобразования файлов в формат XML. Валидация комплекта документов регистрационного досье в формате XML в личном кабинете ФГБУ НЦЭСМП с последующей выгрузкой подтверждения успешной загрузки досье <sup>2</sup> Preparation of registration dossier documents in 12.pdf format (for Modules 2–5, the text of the document must be able to be copied (readable background)) Uploading registration dossier documents in accordance with Classifier <sup>1</sup> in a program with the ability to convert files to XML format. Validation of a set of documents of the registration dossier in XML format in the personal account of the Federal State Budgetary Institution SCESMP, followed by uploading confirmation of successful upload of the dossier <sup>2</sup>

**Примечание.** <sup>1</sup> Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 сентября 2019 г. № 159 "О классификаторе видов документов регистрационного досье лекарственного препарата и справочнике структурных элементов регистрационного досье лекарственного препарата" (в ред. Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.12.2021 № 179) Доступно по: <http://www.eurasiancommission.org/> Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России Доступно по: <https://www.regmed.ru> Ссылка активна на 20.10.2022.

**Note.** <sup>1</sup> Decision of the Board of the Eurasian Economic Commission dated September 17, 2019 No. 159 "On the classifier of types of documents of the registration dossier of a medicinal product and the reference book of structural elements of the registration dossier of a medicinal product" (as amended by the Decision of the Board of the Eurasian Economic Commission dated December 21, 2021 No. 179) Available at: <http://www.eurasiancommission.org/> Accessed: 20.10.2022.

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution "Scientific Center for Expertise of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation Available at: <https://www.regmed.ru>. Accessed: 20.10.2022.

Результатом эффективной и правильно организованной работы специалиста является минимальное количество запросов к заявителю по документам со стороны регуляторного органа и как итог работы положительное решение по любой из процедур с получением комплекта утверждаемых регуляторным органом документов.

Таким образом, профессиональная подготовка специалиста по регистрации должна быть разноплановой и учитывать то, что регистрационное досье включает в себя документы фармацевтической разработки ЛП, производственного процесса ЛП, документы по качеству ЛП, материалы доклинических и клинических исследований ЛП и т. д., которые подлежат анализу и обработке специалистом по регистрации.

Несмотря на вызовы развития отечественной фармацевтической промышленности, современным образованием уделяется недостаточное внимание (уровень подготовки специалитета и бакалавриата) формированию компетенций по данным вопросам. Исключением являются специализированные программы магистратуры по отдельным направлениям подготовки [9].

При этом быстро меняющиеся требования нормативно-правового регулирования данных вопросов определяют с одной стороны сложность подготовки таких специалистов (не соответствие образовательной практики регулярно обновляемым правилам), с другой стороны актуальность регулярного обучения [10].

Необходимо отметить, что на сегодняшний день отдельно не регламентированы профессиональные требования к специалисту отдела по работе с регуляторными органами, а именно к образованию по уровню, квалификации и специализации. Действующими документами утвержден профессиональный стандарт «Специалист по промышленной фармации в области исследований», где среди трудовых функций предусмотрено проведение работ по государственной регистрации и пострегистрационному мониторингу ЛП, включая руководство этими работами. Кроме этого, обозначены необходимые умения и знания такого специалиста, для осуществления следующих трудовых функций:

- подготовка и представление в уполномоченный орган исполнительной власти регистрационного досье на ЛП и изменений в него, материалов и образцов в соответствии с установленными требованиями;
- разработка документации по работам, касающимся государственной регистрации ЛП;
- проведение оценки состояния процессов разработки ЛС и предлагаемых изменений в зарегистрированные препараты на соответствие установленным требованиям и процедурам;

- проведение работ по защите интеллектуальной собственности на разрабатываемые и производимые лекарственные средства;
- подготовка ответов на запросы уполномоченных федеральных органов исполнительной власти в ходе государственной регистрации ЛП, подтверждения государственной регистрации ЛП, внесения изменений в регистрационное досье;
- мониторинг прохождения экспертиз в уполномоченных экспертных организациях;
- мониторинг регуляторной информации и регуляторных прецедентов для решения профессиональных задач по государственной регистрации ЛП;
- распространение регуляторной информации о ЛС по структурным подразделениям фармацевтического производства<sup>1</sup>.

Учитывая обозначенные выше трудовые функции и критичные процессы для обеспечения эффективной работы отдела по работе с регуляторными органами на уровне отдельной организации необходимо решения ряда вопросов:

- систематизировать процессы подготовки регистрационного досье и регистрации ЛП с целью эффективной регистрации ЛП в РФ, на территории ЕАЭС и зарубежных странах;
- сформировать перечень процедур, подлежащих стандартизации, и разработать организационные технологии для эффективной организации процесса регистрации ЛП;
- предложить эффективную структуру отдела по работе с регуляторными органами;
- разработать проекты форм документального сопровождения осуществления процессов;
- определить порядок взаимодействия персонала отдела как с внутренними подразделениями, так и внешними партнерами (заказчиками, регуляторными органами и др.);
- предложить технологии формирования профессиональных специализированных компетенций специалистов по регистрации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обеспечение эффективности работы фармацевтической организации на примере отдела по работе с регуляторными органами можно достигнуть за счет комплексного подхода к организации и стандартизации деятельности отдела по работе с регуляторными органами фармацевтической компании с учетом поставленных задач организацией-производителем в части фармацевтической разработки и последующей

<sup>1</sup> Приказ от 22 мая 2017 г. № 432н об утверждении профессионального стандарта "Специалист по промышленной фармации в области исследований лекарственных средств" Доступно по: <http://www.consultant.ru/> Ссылка активна на 20.10.2022.

регистрацией ЛП, а также, требований внутренних и внешних нормативно-правовых актов Российской Федерации, Евразийского Экономического союза и зарубежных стран.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Николаева А. В. Единый рынок лекарственных средств ЕАЭС: проблемы и перспективы. *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. 2021;2–2(53):183–185.
2. Фотеева А. В., Баршадская О. С., Ростова Н. Б. Процедура взаимного признания при регистрации лекарственных препаратов: новые вызовы или возможности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):159–164. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-159-164.
3. Молчанов И. Н., Молчанова Н. П. Регулирование экономической деятельности в ЕАЭС: тенденции и перспективы сотрудничества. *Государственное управление. Электронный вестник*. 2020;78:53–71.
4. Цындимеев А. Г., Ягудина Р. И., Абдрашитова Г. Т., Крупнов П. А. Совершенствование системы регистрации лекарственных средств в Российской Федерации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):284–287.
5. Нефидова О. Г., Бабаскин Д. В., Сазонов А. Д., Камалетдинова А. А. Анализ основных изменений в правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в рамках Евразийского экономического союза. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2022;12(2):222–226. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-222-226.
6. Кугач А. А., Кугач В. В. Экспертиза и регистрация орфанных лекарственных препаратов. *Вестник фармации*. 2021;1(91):20–35. DOI: 10.52540/2074-9457.2021.1.20.
7. Рычихина Е. М. Подготовка Модуля 1 регистрационного досье на лекарственное средство по процедуре ЕАЭС. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2022;12(3):341–347. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-467.
8. Олефир Ю. В., Рычихина Е. М., Кошечкин К. А. Процедура регистрации ЕАЭС: возможность автоматизации работы. *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике*. 2019;11:34–39.
9. Ан В. С., Серикбаева Э. А., Умурзахова Г. Ж. Оценка организационно-управленческих компетенций у будущих специалистов фармацевтической индустрии. *Фармация Казахстана*. 2021;3:70–74.
10. Таубэ А. А. Реализация компетентного подхода в подготовке кадров высшей квалификации для фармацевтической промышленности. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2021;20(4):213–222.

## REFERENCES

1. Nikolaeva A. V. EAEU single medicinal market: challenges and prospects. *Mezhdunarodnyj zhurnal gumanitarnykh i estestvennykh nauk*. 2021;2–2(53):183–185. (In Russ.)
2. Foteeva A. V., Barshadskaya O. S., Rostova N. B. Mutual Recognition Procedure for the Registration of Medicines: New Challenges or Opportunities. *Drug development & registration*. 2022;11(1):159–164. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-159-164.
3. Molchanov I. N., Molchanova N. P. Regulation of economic activity in the EAEU: trends and prospects for cooperation. *State Administration. Electronic Bulletin*. 2020;78:53–71. (In Russ.)
4. Tsyndymeev A. G., Yagudina R. I., Abdrashitova G. T., Krupnov P. A. Improving the system of registration of medicines in Russian Federation. *Drug development & registration*. 2017;(2):284–287. (In Russ.)

5. Nefidova O. G., Babaskin D. V., Sazonov A. D., Kamaletdinova A. A. Analysis of the main changes in assessment and approval of medicines for human use in the Eurasian Economic Union. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):222–226. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-222-226.
6. Kugach A. A., Kugach V. V. Expertise and registration of orphan medicinal preparations. *Vestnik farmacii*. 2021;1(91):20–35. (In Russ.) DOI: 10.52540/2074-9457.2021.1.20.
7. Rychikhina E. M. Preparation of Module 1 of the registration dossier according to the EAEU Procedure. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(3):341–347. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-467.
8. Olefir Yu. V., Rychikhina E. M., Koshechkin K. A. EAEU registration procedure: the possibility of work automation. *Remedium. Magazine about the Russian market of medicines and medical equipment*. 2019;11:34–39.
9. An V. S., Serikbaeva E. A., Umurzakhova G. Zh. Assessment of the organizational and managerial competence of future specialists in the pharmaceutical industry. *Farmaciya Kazahstana*. 2021;3:70–74.
10. Taube A. A. Implementation of the competence-based approach in the training of highly qualified personnel for the pharmaceutical industry. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*. 2021;20(4):213–222.

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-139-148](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-139-148)  
УДК 615.1:615.065



Оригинальная статья / Research article

## О формировании профессионально-специализированных компетенций и обучении специалистов и руководителей в системе фармаконадзора держателя регистрационного удостоверения

Е. Ю. Курганова<sup>1</sup>, А. В. Солонина<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup> АО «Медисорб», 614042, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Гальперина, д. 6

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

✉ Контактное лицо: Солонина Анна Владимировна. E-mail: soloninina@mail.ru

ORCID: Е. Ю. Курганова – <https://orcid.org/0000-0001-8684-5407>; А. В. Солонина – <https://orcid.org/0000-0002-2745-7698>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 02.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

### Резюме

**Введение.** Ключевую роль в организации системы фармаконадзора занимает держатель регистрационного удостоверения (ДРУ), осуществляющий мониторинг безопасности и эффективности на всех этапах жизненного цикла ЛС, необходимость которого определена нормативными документами в области фармаконадзора. Возможность обеспечения требуемого качества выполнения процессов и получаемых результатов в системе фармаконадзора ДРУ непосредственно связана с наличием достаточного количества компетентного, квалифицированного и обученного персонала в подразделениях, тесно взаимодействующих в системе фармаконадзора ДРУ, что обуславливает необходимость формирования соответствующих компетенций по выполнению процедур, предусмотренных при выявлении изменений профиля безопасности ЛС. Неотъемлемой частью формирования компетенций сотрудников и подразделений, вовлеченных в систему фармаконадзора ДРУ, является обучение по специально разработанной программе и оценка его эффективности.

**Цель.** Обоснование формирования профессионально-специализированных компетенций и обучение сотрудников в системе фармаконадзора ДРУ.

**Материалы и методы.** В качестве материалов исследования выступали результаты трудов отечественных ученых, данные собственных исследований и нормативные правовые акты, регламентирующие фармаконадзор в РФ, ЕАЭС. В качестве методов исследования использованы методы социологического, логического анализа, интерактивного обучения.

**Результаты и обсуждение.** Установлена необходимость и сформированы профессионально-специализированные компетенции руководителей и специалистов держателя регистрационного удостоверения в системе фармаконадзора, для овладения которыми разработана образовательная программа и проведено обучение. Внедрено информационное и методическое обеспечение персонала.

**Заключение.** В ходе проведенного исследования установлено, что обучение является неотъемлемой частью организации самостоятельного рабочего процесса сотрудника. Для достижения качественного выполнения процессов и задач, связанных с фармаконадзором, в ДРУ необходимо иметь достаточное количество компетентного и обученного персонала. С целью актуализации полученных знаний по фармаконадзору целесообразно осуществлять внутрикорпоративное обучение с определенной периодичностью.

**Ключевые слова:** система фармаконадзора ДРУ, лекарственные препараты, обучение сотрудников

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

**Вклад авторов.** Авторы совместно продумывали концепцию статьи, проводили поиск и сбор материала в нормативных правовых актах, проводили анкетирование руководителей и специалистов ДРУ, готовили текст статьи и оформляли его в соответствии с общемедицинским профилем журнала.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

**Для цитирования:** Курганова Е. Ю., Солонина А. В. О формировании профессионально-специализированных компетенций и обучении специалистов и руководителей в системе фармаконадзора держателя регистрационного удостоверения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):139–148. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-139-148](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-139-148)

## On the Formation of Professionally Specialized Competencies and Training of Specialists and Managers in the Pharmacovigilance System of the Marketing Authorization Holder

Evgeniia Yu. Kurganova<sup>1</sup>, Anna V. Solonina<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup> JSC "Medisorb", 6, Galperina str., Perm, Perm region, 614042, Russia

<sup>2</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

✉ Corresponding author: Anna. V. Solonina. E-mail: soloninina@mail.ru

ORCID: Evgeniia Yu. Kurganova – <https://orcid.org/0000-0001-8684-5407>; Anna. V. Solonina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-7698>.

Received: 14.10.2022

Revised: 02.12.2022

Published: 27.12.2022

© Курганова Е. Ю., Солонина А. В., 2022

© Kurganova E. Yu., Solonina A. V., 2022

## Abstract

**Introduction.** The key role in the organization of the pharmacovigilance system is played by the Marketing Authorization Holder (MAH), who monitors the safety and effectiveness at all stages of the life cycle of drugs, the need for which is determined by regulatory documents in the field of pharmacovigilance. The possibility of ensuring the required quality of the processes and the results obtained in the pharmacovigilance system of the MAH is directly related to the availability of a sufficient number of competent, qualified and trained personnel in the units that closely interact in the pharmacovigilance system of the MAH, which necessitates the formation of appropriate competencies for the implementation of procedures provided for when identifying changes in the safety profile of drugs. An integral part of the formation of competencies of employees and departments involved in the pharmacovigilance system of the MAH is training according to a specially developed program and evaluation of its effectiveness.

**Aim.** Substantiation of the formation of professionally specialized competencies and training of employees in the pharmacovigilance system of the MAH.

**Materials and methods.** The research materials were the results of the works of domestic scientists, data from their own research and regulatory legal acts regulating pharmacovigilance in the Russian Federation, the EAEU. Methods of sociological, logical analysis, and interactive learning were used as research methods.

**Results and discussion.** The necessity has been established and the professionally specialized competencies of managers and specialists of the MAH in the pharmacovigilance system have been formed, for the mastery of which an educational program has been developed and training has been conducted. Information and methodological support of personnel has been introduced.

**Conclusion.** In the course of the conducted research, it was found that training is an integral part of the organization of an employee's independent workflow. In order to achieve high-quality performance of processes and tasks related to pharmacovigilance, it is necessary to have a sufficient number of competent and trained personnel in the MAH. In order to update the acquired knowledge on pharmacovigilance, it is advisable to carry out intra-corporate training with a certain frequency.

**Keywords:** the system of pharmacovigilance of the Marketing Authorization Holder, medicines, training of employees

**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.** The authors jointly thought out the concept of the article, searched and collected material in regulatory legal acts, conducted a survey of managers and specialists of the MAH, prepared the text of the article and designed it in accordance with the general medical profile of the journal.

**Funding.** The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

**For citation:** Kurganova E. Yu., Soloninina A. V. On the formation of professionally specialized competencies and training of specialists and managers in the pharmacovigilance system of the marketing authorization holder. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):139–148. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-139-148](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-139-148)

## ВВЕДЕНИЕ

Ключевую роль в организации системы фармаконадзора занимает держатель регистрационного удостоверения (ДРУ), осуществляющий мониторинг безопасности и эффективности на всех этапах жизненного цикла ЛС, необходимость которого определена нормативными документами в области фармаконадзора<sup>1,2,3</sup>. Возможность обеспечения требуемого качества выполнения процессов и получаемых резуль-

татов в системе фармаконадзора ДРУ непосредственно связана с наличием достаточного количества компетентного, квалифицированного и обученного персонала в подразделениях, тесно взаимодействующих в системе фармаконадзора ДРУ [1, 2]. Проблема низкой вовлеченности специалистов обуславливает необходимость формирования соответствующих компетенций по выполнению процедур, предусмотренных при выявлении изменений профиля безопасности ЛС [3–5]. Помимо сбора спонтанных сообщений от потребителей специалистам необходимо проводить мониторинг научной и не научной литературы, социальных сетей, сайтов регуляторных органов и международных организаций [6–8]. Также является важным обеспечивать сбор и обработку информации по безопасности и эффективности, полученной в ходе клинических исследований [9].

Неотъемлемой частью формирования компетенций сотрудников и подразделений, вовлеченных в систему фармаконадзора ДРУ, является обучение по специально разработанной программе и оценка его эффективности.

<sup>1</sup> Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/902209774>. Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>2</sup> Решение № 87 «Об утверждении Правил надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза» от 03. 11. 2016 г. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026106>. Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>3</sup> Приказ Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения от 15.02.2017 г. № 1071 «Об утверждении порядка осуществления фармаконадзора». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/420394411>. Ссылка активна на 20.10.2022.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в несколько этапов. На первом этапе нами проведено методическое обоснование формирования профессионально – специализированных компетенций (ПСК) для ДРУ, включающее:

- нормативно-правовое обоснование необходимости разработки ПСК по фармаконадзору;
- формулирование ПСК и индикаторов их достижения;
- обоснование содержания образовательных программ;
- оценку информированности специалистов и руководителей;

- разработку информационного и методического обеспечения специалистов, участвующих в сборе, анализе и передаче информации по безопасности и эффективности ЛП;
- проведение обучения специалистов и определение его эффективности (рисунок 1).

На первом этапе проводимого нами исследования были проанализированы основные нормативные правовые документы по фармаконадзору в части формирования профессионально-специализированных компетенций руководителей и специалистов ДРУ (рисунок 2).



Рисунок 1. Методическое обоснование формирования профессионально-специализированных компетенций

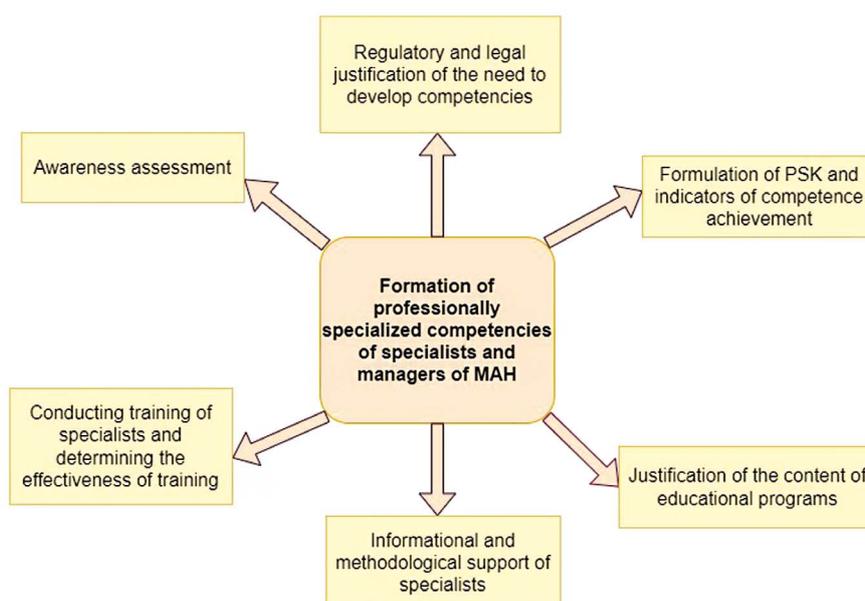


Figure 1. Methodological justification of the formation of the professional and specialized competencies

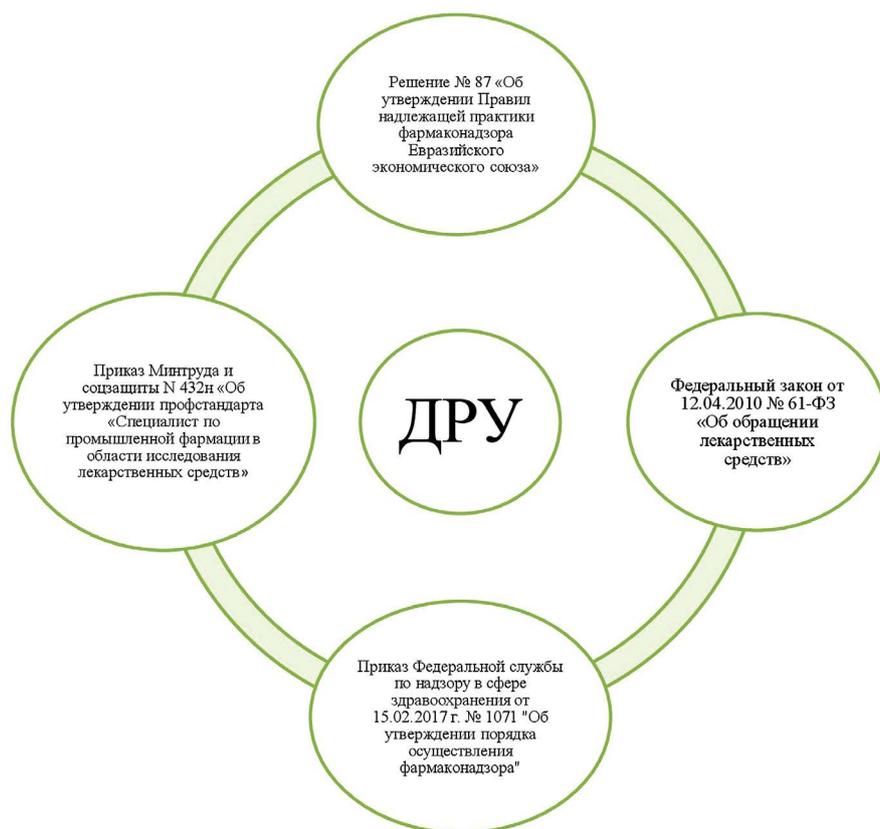


Рисунок 2. Нормативные документы, используемые держателем регистрационного удостоверения в части фармаконадзора

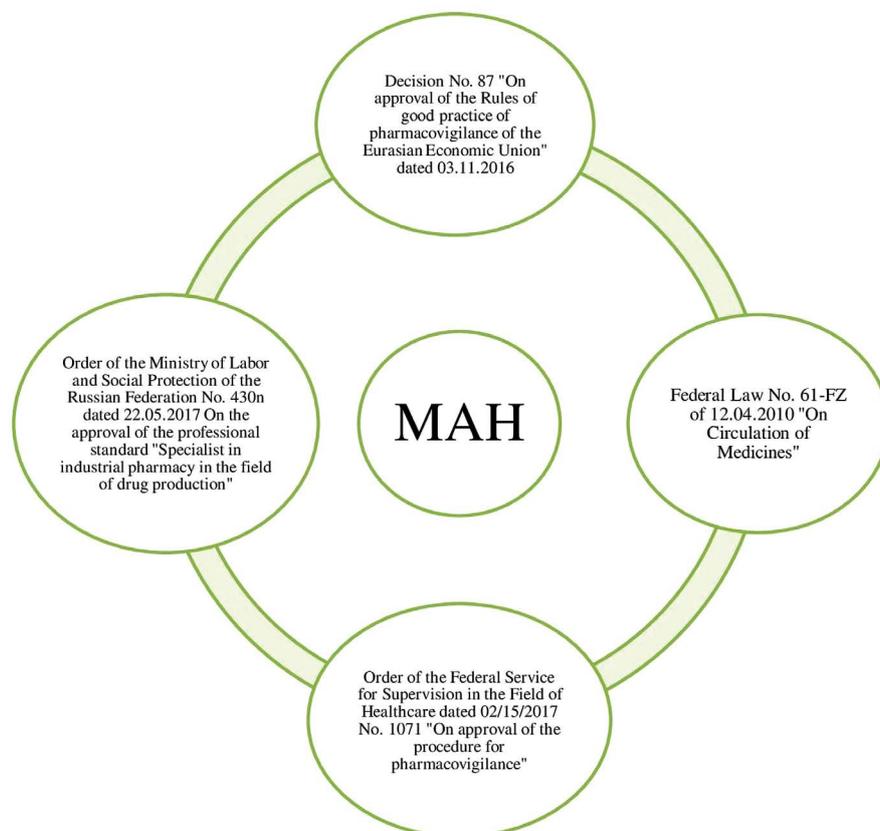


Figure 2. Regulatory documents used by the Marketing Authorization Holder in terms of pharmacovigilance

Так, в соответствии с п. 2.4 Решения № 87 («Об утверждении Правил надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза»), «Обучение должно быть направлено на повышение соответствующих профессиональных навыков, внедрение научных достижений в практику и выполняемые процедуры, обеспечение соответствия всех специалистов требованиям к квалификации, профессиональным навыкам, знаниям и пониманию выполняемых процедур, связанных с фармаконадзором»<sup>1</sup>. Для формирования компетенций руководителей и специалистов ДРУ, осуществляющих деятельность по фармаконадзору, следует учитывать требования профессионального стандарта «Специалист по промышленной фармации в области исследования лекарственных средств» (вид деятельности «Организационное и регуляторное сопровождение прикладных исследований в области разработки новых ЛС и усовершенствования промышленно производимых ЛС»)². В профстандарте фармаконадзору посвящены две трудовые функции: проведение мониторинга безопасности ЛП (для специалистов) и руководство работами по мониторингу безопасности ЛП (для руководителей).

Учитывая требования НД и профстандарта, на следующем этапе исследования мы установили цели формирования профессионально-специализированных компетенций ДРУ и сформулировали профессионально-специализированные компетенции (ПСК) и индикаторы достижения компетенций (ИДК) для работников ДРУ, задействованных в осуществлении фармаконадзора.

Так, для организации и ведения системы фармаконадзора на предприятии ДРУ должен назначить и иметь в постоянном распоряжении уполномоченное лицо по фармаконадзору (УЛФ), обладающее знаниями, навыками и соответствующей квалификацией. Одной из основных задач УЛФ является организация работы с информацией о нежелательных реакциях ЛС (проведение сбора и упорядочение сообщений о подозреваемых нежелательных реакциях, связываемых с применением лекарственных препаратов, полученных из различных источников без предварительного запроса и поступивших по запросу, их научно-обоснованная оценка) [10, 11]. Для организации и развития системы фармаконадзора ДРУ целе-

сообразно выделить отдел фармаконадзора и медицинской информации, возглавляемый УЛФ и имеющий в составе специалистов, осуществляющих необходимые функции по ФН [12]. В качестве дополнительных инструментов, обеспечивающих эффективную работу системы фармаконадзора ДРУ могут выступать различные современные технологические решения в сфере мониторинга информации по безопасности и эффективности [13, 14].

В этой связи для отдела фармаконадзора и медицинской информации нами сформулированы ПСК и индикаторы их достижения отдельно для должностей руководителя отдела/УЛФ и специалиста отдела, которые приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы, для руководителя отдела/УЛФ нами сформулированы 3 ПСК и 11 индикаторов их достижения. Для специалиста отдела нами предлагаются 3 ПСК и 7 индикаторов их достижения.

Успех работы в системе фармаконадзора в значительной степени зависит от слаженной работы сотрудников и подразделений, вовлеченных в систему фармаконадзора. К отделам и работникам ДРУ, тесно взаимодействующим в системе фармаконадзора ДРУ, нами отнесены, наряду с работниками отдела фармаконадзора и медицинской информации: руководители и специалисты службы качества, отделов маркетинга и продаж и управления персоналом. Безусловно, слаженная работа сотрудников и подразделений, вовлеченных в систему фармаконадзора, является важным принципом работы в данной области, что требует для этих работников разработки соответствующих ПСК и индикаторов их достижения. Для руководителей и специалистов отделов, вовлеченных в систему ФН, нами также разработаны также ПСК и индикатор ее достижения (таблица 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

На следующем этапе нашего исследования мы провели анкетирование и оценили знания сотрудников ДРУ по вопросам фармаконадзора до проведения обучения. В анкетировании принимали участие респонденты, имеющие высшее образование по различным направлениям – фармация, экономика, химия, биотехнология. Из 58 респондентов лишь 15,5 % ранее встречались с понятием фармаконадзор, при этом 51,7 % опрошенных хотя бы раз в жизни встречались с нежелательными реакциями на лекарственный препарат.

Мы предложили респондентам оценить свои знания по вопросам нормативных документов по фармаконадзору и сбора и передачи спонтанных сообщений по безопасности и эффективности ЛС. Результаты оказались неутешительными, 74,1 % респондентов оценили свой уровень как низкий, 19 % как, скорее низкий, чем средний и 6,9 % как средний (рисунок 3).

<sup>1</sup> Решение № 87 «Об утверждении Правил надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 г. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026106>. Ссылка активна на 20.10.2022.

<sup>2</sup> Приказ Минтруда и социальной защиты РФ от 22.05.2017 г. № 430н «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист по промышленной фармации в области производства лекарственных средств». Доступно по: <https://base.garant.ru/71692422/> Ссылка активна на 20.10.2022.

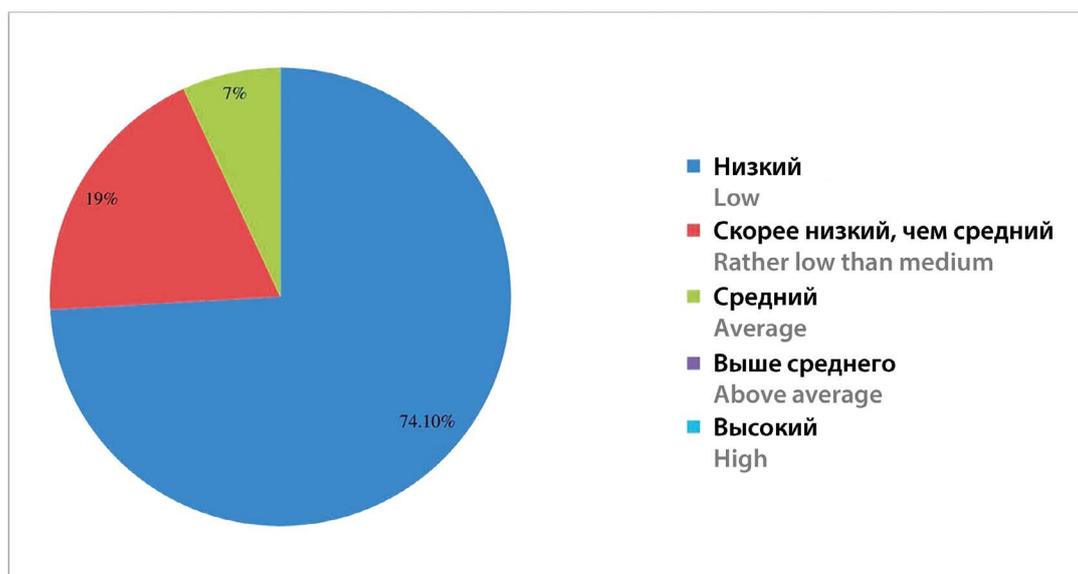
Таблица 1. Профессионально-специализированные компетенции специалистов держателя регистрационного удостоверения по фармаконадзору

Table 1. Professional and specialized competencies by the Marketing Authorization Holder pharmacovigilance specialists

Организация/ Подразделение Organization/ Division	Должность Post	Код и наименование профессионально-специализированной компетенции Code and name of the professionally specialized competence	Код и наименование индикатора достижения профессионально-специализированной компетенции Code and name of the indicator of achievement of professional and specialized competence	Основание (ПС, анализ опыта) The basis (PS, analysis of experience)
ДРУ/ОФНИМИ МАН / Pharmacovigilance and Medical Information Department	Руководитель / УЛФ Head of Department/ Qualified Person Responsible for Pharmacovigilance (QPPV)	<p>ПСК-1 Способен к руководству и контролю ведения документации по фармаконадзору и взаимодействию с регуляторными органами</p> <p>PSK-1 is capable of directing and controlling the documentation on pharmacovigilance and interaction with regulatory authorities</p>	<p>ИД<sub>пск-1</sub>-1 Проверяет периодические отчеты по безопасности ID<sub>psk-1</sub>-1 Checks periodic safety reports</p> <p>ИД<sub>пск-1</sub>-2 Проверяет написание планов управления рисками ID<sub>psk-1</sub>-2 Checks the writing of risk management plans</p> <p>ИД<sub>пск-1</sub>-3 Ведет мастер-файл по фармаконадзору ID<sub>psk-1</sub>-3 Maintains a master file on pharmacovigilance</p> <p>ИД<sub>пск-1</sub>-4 Проводит анализ «польза/риск» ID<sub>psk-1</sub>-4 Conducts a Benefit/Risk analysis</p> <p>ИД<sub>пск-1</sub>-5 Проводит прием запросов и формирует ответ на запросы регулятора ID<sub>psk-1</sub>-5 Receives requests and forms a response to the regulator's requests</p> <p>ИД<sub>пск-1</sub>-6 Ведет личный кабинет АИС Росздравнадзор ID<sub>psk-1</sub>-6 Maintains a personal account of AIS Roszdravnadzor</p> <p>ИД<sub>пск-1</sub>-7 Обменивается данными по безопасности и эффективности с регулятором ID<sub>psk-1</sub>-7 Exchanges safety and efficiency data with the regulator</p>	<p>02.010 Специалист по промышленной фармации в области исследования ЛС 02.010 Specialist in industrial pharmacy in the field of drug research</p>
		<p>ПСК-2 Способен к руководству и контролю проведения мониторинга эффективности и безопасности зарегистрированных ЛП</p> <p>PSK-2 is capable of directing and controlling the monitoring of the effectiveness and safety of registered medicinal product</p>	<p>ИД<sub>пск-2</sub>-1 Проверяет заполнения внутренней документации ID<sub>psk-2</sub>-1 Checks the completion of internal documentation</p> <p>ИД<sub>пск-2</sub>-2 Реализует контроль за соблюдением СОП ID<sub>psk-2</sub>-2 Implements control over compliance with standard operating procedures</p>	
		<p>ПСК-3 Способен контролировать проведение периодического обучения персонала по фармаконадзору, согласно плану внутреннего обучения</p> <p>PSK-3 is able to monitor the passage of periodic training of personnel on pharmacovigilance, according to the internal training plan</p>	<p>ИД<sub>пск-3</sub>-1 Обновляет программы обучения руководителей и специалистов ID<sub>psk-3</sub>-1 Updates training programs for managers and specialists</p> <p>ИД<sub>пск-3</sub>-2 Проводит внеочередное обучение и контроль полученных навыков ID<sub>psk-3</sub>-2 Conducts extraordinary training and control of acquired skills</p>	

Окончание таблицы 1

Организация/ Подразделение Organization/ Division	Должность Post	Код и наименование профессионально-специализированной компетенции Code and name of the professionally specialized competence	Код и наименование индикатора достижения профессионально-специализированной компетенции Code and name of the indicator of achievement of professional and specialized competence	Основание (ПС, анализ опыта) The basis (PS, analysis of experience)
ДРУ/ОФНИМИ МАН / Pharmacovigilance and Medical Information Department	Специалист Specialist	<p>ИД<sub>пск4</sub>-1 Проводит еженедельный скрининг данных по фармаконадзору научной и не научной литературы.</p> <p>ИД<sub>пск4</sub>-2 Выявляет сигналы.</p> <p>ИД<sub>пск4</sub>-3 Проводит прием, обработку и анализ спонтанных сообщений.</p> <p>ИД<sub>пск4</sub>-4 Проводит расследования по полученным спонтанным сообщениям</p> <p>ПСК-4 Способен проводить пострегистрационный мониторинг эффективности и безопасности ЛС PSK-4 is capable of conducting post-registration monitoring of the effectiveness and safety of drugs</p>	<p>ИД<sub>пск4</sub>-1 Проводит еженедельный скрининг данных по фармаконадзору научной и не научной литературы.</p> <p>ИД<sub>пск4</sub>-2 Выявляет сигналы.</p> <p>ИД<sub>пск4</sub>-3 Проводит прием, обработку и анализ спонтанных сообщений.</p> <p>ИД<sub>пск4</sub>-4 Проводит расследования по полученным спонтанным сообщениям</p> <p>ID<sub>psk-4</sub>-1 Conduct weekly screening of data on pharmacovigilance of scientific and non-scientific literature.</p> <p>ID<sub>psk-4</sub>-2 Detects signals.</p> <p>ID<sub>psk-4</sub>-3 Receives, processes and analyzes spontaneous messages.</p> <p>ID<sub>psk-4</sub>-4 Conducts investigations on spontaneous messages received</p>	
		<p>ПСК-5 Способен вести документацию по фармаконадзору PSK-5 is capable of maintaining pharmacovigilance documentation</p>	<p>ИД<sub>пск5</sub>-1 Составляет периодические отчеты по безопасности.</p> <p>ИД<sub>пск5</sub>-2 Разрабатывает планы управления рисками</p> <p>ID<sub>psk-5</sub>-1 Compiles periodic safety reports.</p> <p>ID<sub>psk-5</sub>-2 Develops risk management plans</p>	02.010 Специалист по промышленности фармации в области исследования ЛС 02.010 Specialist in industrial pharmacy in the field of drug research
		<p>ПСК-6 Способен обучать вновь принятых сотрудников PSK-6 is able to train newly hired employees</p>	<p>ИД<sub>пск6</sub>-1 Проводит обучение согласно разработанного плана вновь принятых сотрудников по вопросам надлежащей практики фармаконадзора ДРУ</p> <p>ID<sub>psk-6</sub>-1 Conducts training according to the developed plan of newly hired employees on the issues of good practice of pharmacovigilance of other</p>	
ДРУ/отдель ДРУ МАН/ Departments МАН	Руководитель/Специалист Head of Department / Specialist	<p>ПСК-7 Способен работать со спонтанными сообщениями PSK-7 is able to work with spontaneous messages</p>	<p>ИД<sub>пск7</sub>-1 Собирает и передает сообщения по безопасности и эффективности производимых препаратов от субъектов обращения ЛС и потребителей в ОФНИМИ/УЛОФ</p> <p>ID<sub>psk-7</sub>-1 Collects and transmits messages on the safety and effectiveness of manufactured drugs from subjects of drug treatment and consumers to Pharmacovigilance and Medical Information Department/QPPV</p>	



**Рисунок 3.** Распределение респондентов по самооценке уровня знаний по вопросам знания нормативных документов и сбора и передачи спонтанных сообщений

**Figure 3.** Distribution of respondents on self-assessment of the level of knowledge on the issues of knowledge of regulatory documents and the collection and transmission of spontaneous messages

Респондентам было предложено отметить, куда необходимо передавать сообщение по безопасности и эффективности ЛС. Судя по ответам, 10,3 % респондентов считают, что сообщение по безопасности и эффективности ЛС необходимо передавать в Росздравнадзор, 20,7 % респондентов считают, что эту информацию следует передать врачу, 19 % – работнику аптеки, 15,5 % респондентов – в отдел фармаконадзора или качества производителя, 34,5 % респондентов никому бы не передали полученное сообщение о НР.

Результаты изучения позволяют сделать вывод о низкой информированности по вопросам фармаконадзора вновь принятых сотрудников, необходимости проведения обучения и разработки информационного и методического обеспечения специалистов.

Для формирования навыков и умений, необходимых для соблюдения требований GVP в части работы с индивидуальными сообщениями по безопасности и эффективности руководителей и специалистов ДРУ, на следующем этапе нашего исследования нами разработана обучающая программа «Основы надлежащей практики фармаконадзора».

Программа самостоятельной подготовки руководителей и специалистов «Основам надлежащей практики фармаконадзора (GVP)» включает в себя 8 тематических блоков: введение; нормативную базу, регламентирующую фармаконадзор; методы фармаконадзора; типы индивидуальных сообщений и навыки распознавания нежелательных реакций; правила общения с потребителем; источники получения информации по безопасности и эффективности лекарст-

венных препаратов; формы документации; контроль полученных навыков (рисунок 4).

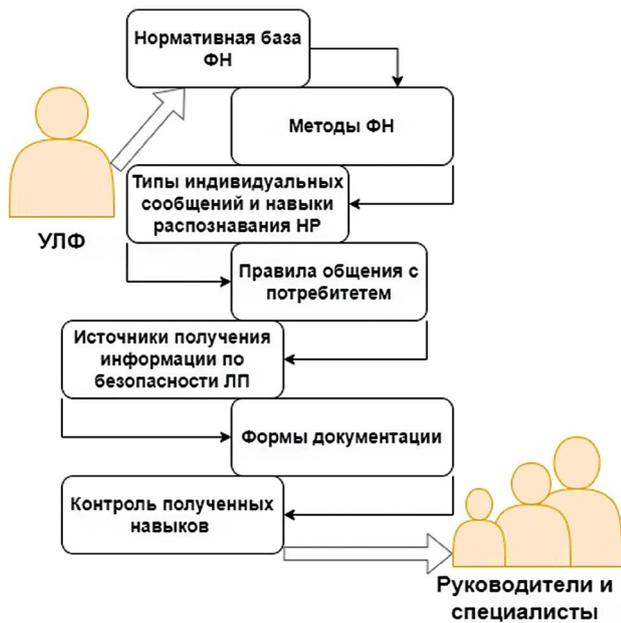
В процессе обучения по программе обучающиеся знакомятся с целями и задачами GVP, основными терминами и понятиями, нормативными правовыми документами, типами сообщений по безопасности и эффективности, нормами общения с потребителями, видами источников и каналами получения информации, порядком действий при получении спонтанных сообщений. Все это формирует представление о работе системы фармаконадзора ДРУ.

Так, в результате изучения основ GVP обучающиеся должны знать:

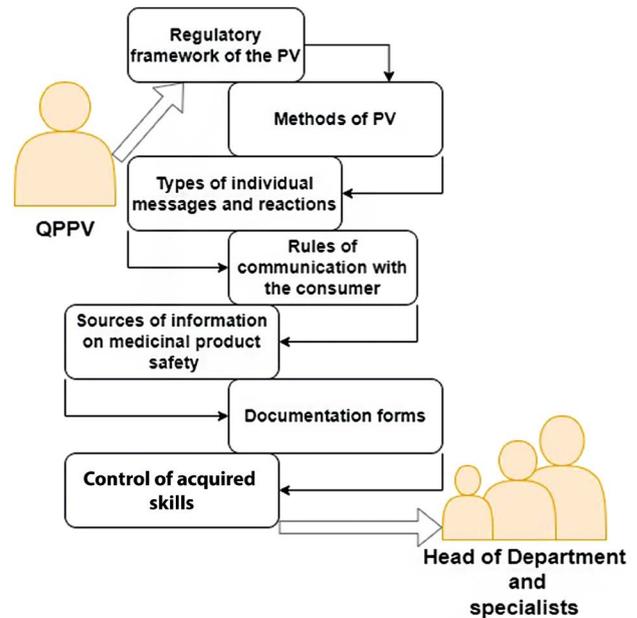
- признаки индивидуального сообщения по безопасности и эффективности;
- основные принципы и требования сбора информации об индивидуальном сообщении в соответствии с нормативными документами;
- риски для фармаконадзора, фармацевтической компании/ДРУ, потребителей при не соблюдении правил GVP;
- типы и формы внутренней документации по сбору и регистрации спонтанных сообщений;
- порядок действий при выявлении спонтанного сообщения.

Должны понимать:

- важность соблюдения правил GVP;
- значение проводимых в компании мероприятий по сбору и регистрации сообщений;
- важность четкого следования установленным внутренним инструкциям и процедурам;
- свою ответственность за безопасность и эффективность производимых ЛС.



**Рисунок 4.** Схема потоков данных получения профессионально-специализированных компетенций у держателя регистрационного удостоверения, согласно программе обучения



**Figure 4.** Data flow diagram of obtaining professional and specialized competencies from the Marketing Authorization Holder, according to the training program

По окончании обучения все задействованные сотрудники проходят проверку знаний в формате тестового контроля и ситуационных задач, позволяющих оценить уровень овладения соответствующими компетенциями. Результаты обучения документируются надлежащим образом с помощью протокола проведения теоретических занятий, который хранится в архиве ДРУ.

Повторное обучение и внеочередная проверка знаний, независимо от срока предыдущей проверки, проводится в случае выявления ненадлежащего исполнения обязанностей по сбору, регистрации и передаче сообщений.

Внеплановое обучение и проверка знаний проводится в случае внесения изменений в нормативные документы по фармаконадзору, определяющие порядок работы с сообщениями, а также возникновение экстренных ситуаций в здравоохранении.

Разработанная нами программа «Основы надлежащей практики фармаконадзора» была внедрена на фармацевтическом предприятии ДРУ. На последнем этапе нашего исследования в качестве апробации программы проведено обучение и оценка компетентности руководителей и специалистов ДРУ методом анкетирования.

После обучения 37,9% респондентов оценили уровень своих знаний по вопросам сбора и передачи спонтанных сообщений по безопасности и эффективности ЛС выше среднего, 5,2% – как высокий, 27,6% – средний, 13,8% – скорее низкий, чем средний и 15,5% – как низкий.

На вопрос о передаче сообщений по безопасности и эффективности 89,7% респондентов отметили, что будут передавать полученное спонтанное сообщение в отдел фармаконадзора и медицинской информации.

Нами были предложены несколько способов передачи спонтанных сообщений внутри компании. В качестве наиболее удобного способа 67,2% респондентов выбрали передачу сообщений по электронной почте ответственным лицам, на втором месте (46,6%), был выделен протокол передачи данных в электронном виде, наименьшее количество респондентов (12,1%), отдали свой голос в пользу бумажного протокола передачи данных. При этом 96,5% респондентов будут использовать на рабочем месте краткую памятку о порядке действий при получении спонтанного сообщения, которая была предусмотрена в программе обучения. При высоком потоке ежедневной информации, внутренняя памятка для сотрудников поможет четко и грамотно оформить и передать информацию по спонтанным сообщениям ответственным лицам по фармаконадзору ДРУ. Результаты анкетирования позволили сделать вывод об эффективности разработанной системы внутреннего обучения сотрудников и достижении цели обучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги исследования, необходимо отметить, что для достижения качественного выполнения процессов и задач, связанных с фармаконадзором, в ДРУ необходимо иметь достаточное количество пер-

сонала, обладающего соответствующими компетенциями. С целью актуализации полученных знаний по фармаконадзору целесообразно осуществлять внутрикорпоративное обучение с определенной периодичностью, в соответствии с правилами надлежащей практики фармаконадзора. Дополнительными мерами повышения эффективности работы руководителей и специалистов на местах могут служить памятки, курсы, семинары, круглые столы и конференции.

## ЛИТЕРАТУРА

- Сафиуллин Р. С., Крашенников А. Е. Роль фармацевтов в совершенствовании системы фармаконадзора в России. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2018;3(21): 58–61.
- Крашенников А. Е., Сафиуллин Р. С. Практика формирования у фармацевтических работников дополнительных профессиональных компетенций в сфере фармаконадзора. *Современная организация лекарственного обеспечения*. 2018;4:16–19.
- Pires K. A systematic review on learning outcomes of pharmacovigilance issues: Undergraduates of pharmacy. *International Journal of Educational Research*. 2021;109:101845. DOI: 10.1016/j.ijer.2021.101845.
- Торган Е. С. Исследование информированности фармацевтических специалистов о системе фармаконадзора. *Тезисы доклада на конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина-человек и его здоровье»*. 2019;22:238–239.
- Афанасьева Т. Г., Стародубцева И. О. Оценка информированности фармацевтических работников о их компетенции в вопросах фармаконадзора. *Евразийский союз ученых*. 2019;2:37–39. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2019.2.59.37-39
- Bihan K, Lebrun-Vignes B, Funck-Brentano C, Salem J. E. Uses of pharmacovigilance databases: An overview. *Therapie*. 2020;75(6):591–598. DOI: 10.1016/j.therap.2020.02.022.
- Мильчаков К. С. Рекомендации по мониторингу информации о безопасности и эффективности лекарственных препаратов в Российской Федерации в контексте фармаконадзора. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2022;10(3):218–229. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-218-229. Accessed: 21.10.2022.
- De Rosa M., Fenza G., Gallo A., Gallo M., Loia V. Pharmacovigilance in the era of social media: Discovering adverse drug events cross-relating Twitter and PubMed. *Future Generation Computer Systems*. 2021;114:394–402. DOI: 10.1016/j.future.2020.08.020.
- Dobson R., Craner M., Waddingham E., Miller A., Pindoria J., Cavey A., Blain C. Blain C., De Luca G., Evangelou N., Ford H., Gallagher P., George K., Geraldес Ramos Dias R., Harman P., Hobart J., King T., Linighan R., MacDougall N., Marta M., Mitchell S., Nicholas R., Rog D., Scalfari A., Scolding N., Webb S., White S., Wilton J., Young C., Matthews P. M. Evaluating the feasibility of a real world pharmacovigilance study (OPTIMISE:MS). *Mult Scler Relat Disord*. 2022;63:103894. DOI: 10.1016/j.msard.2022.103894.
- Beninger P. Signal Management in Pharmacovigilance: A Review of Activities and Case Studies. *Clin Ther*. 2020;42(6):1110–1129. DOI: 10.1016/j.clinthera.2020.03.018.
- Шукиль Л. В., Фоминых С. Г., Ахмедов В. А., Перепичкина Т. Е. Рациональная организация сбора информации о нежелательных реакциях на лекарственные средства. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2022;10(3):251–258. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-251-258.
- Crescioli G., Bonaiuti R., Corradetti R., Mannaioni G., Vannacci A., Lombardi N. Pharmacovigilance and Pharmacoepidemiology as a Guarantee of Patient Safety: The Role of the Clinical Pharmacologist. *J Clin Med*. 2022;20;11(12):3552. DOI: 10.3390/jcm11123552.
- Логиновская О. А., Колбатов В. П., Сухов Р. В., Рязкина М. С., Колбин А. С. Новые технологии в электронных системах по фармаконадзору для держателей регистрационных удостове-

ний. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2022;10(3):230–239. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-230-239.

- 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.

## REFERENCES

- Safiullin R. S., Krashennnikov A. E. The role of pharmacists in improving the pharmacovigilance system in Russia. *Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issues*. 2018;3(21):58–61. (In Russ.)
- Krashennnikov A. E., Safiullin R. S. The practice of forming additional professional competencies in the field of pharmacovigilance among pharmaceutical workers. *Modern organization of drug supply*. 2018;4:16–19. (In Russ.)
- Pires K. A systematic review on learning outcomes of pharmacovigilance issues: Undergraduates of pharmacy. *International Journal of Educational Research*. 2021;109:101845. DOI: 10.1016/j.ijer.2021.101845.
- Torgan E. S. Research of pharmaceutical specialists awareness about the pharmacovigilance system. *Abstracts of the report at the conference “Fundamental Science and Clinical Medicine-Homo and Health”*. 2019;22:238–239. (In Russ.)
- Afanasyeva T. G., Starodubtseva I. O. Assessment of pharmaceutical workers awareness of their competence in pharmacovigilance issues. *Eurasian Union of Scientists*. 2019;2:37–39. (In Russ.) DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2019.2.59.37-39.
- Bihan K, Lebrun-Vignes B, Funck-Brentano C, Salem J. E. Uses of pharmacovigilance databases: An overview. *Therapie*. 2020;75(6):591–598. DOI: 10.1016/j.therap.2020.02.022.
- Milchakov K. S. Recommendations on Informational Monitoring of the Safety and Efficacy of Medicinal Products in the Russian Federation as Part of Pharmacovigilance. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2022;10(3):218–229. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-218-229.
- De Rosa M., Fenza G., Gallo A., Gallo M., Loia V. Pharmacovigilance in the era of social media: Discovering adverse drug events cross-relating Twitter and PubMed. *Future Generation Computer Systems*. 2021;114:394–402. DOI: 10.1016/j.future.2020.08.020.
- Dobson R., Craner M., Waddingham E., Miller A., Pindoria J., Cavey A., Blain C. Blain C., De Luca G., Evangelou N., Ford H., Gallagher P., George K., Geraldес Ramos Dias R., Harman P., Hobart J., King T., Linighan R., MacDougall N., Marta M., Mitchell S., Nicholas R., Rog D., Scalfari A., Scolding N., Webb S., White S., Wilton J., Young C., Matthews P. M. Evaluating the feasibility of a real world pharmacovigilance study (OPTIMISE:MS). *Mult Scler Relat Disord*. 2022;63:103894. DOI: 10.1016/j.msard.2022.103894.
- Beninger P. Signal Management in Pharmacovigilance: A Review of Activities and Case Studies. *Clin Ther*. 2020;42(6):1110–1129. DOI: 10.1016/j.clinthera.2020.03.018.
- Shukil L. V., Fominykh S. G., Akhmedov V. A., Perepichkina T. E. Rational Organisation of Adverse Drug Reaction Monitoring. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2022;10(3):251–258. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-251-258.
- Crescioli G., Bonaiuti R., Corradetti R., Mannaioni G., Vannacci A., Lombardi N. Pharmacovigilance and Pharmacoepidemiology as a Guarantee of Patient Safety: The Role of the Clinical Pharmacologist. *J Clin Med*. 2022;20;11(12):3552. DOI: 10.3390/jcm11123552.
- Loginovskaya O. A., Kolbatov V. P., Sukhov R. V., Ryavkina M. S., Kolbin A. S. New Technologies in Electronic Pharmacovigilance Systems for Marketing Authorisation Holders. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2022;10(3):230–239. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-230-239.
- 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.

## ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «**Разработка и регистрация лекарственных средств**», должно соответствовать 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 предоставляет приоритет для аспирантских и докторских работ, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате \*.pdf или \*.jpg).

### ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «**Разработка и регистрация лекарственных средств**». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и 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=hdac5trtkb73ae013ofk4g8nr1v>)

**Ключевые слова:** (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах и не повторять название статьи.

**Вклад авторов.** Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

#### АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

##### Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

##### Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

##### Образец оформления

Mental Health Research Institute  
4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

##### Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

##### Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

**Contribution of the authors.** Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

#### ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

##### Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

##### Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств ([grls.rosminzdrav.ru](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-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: Синдронол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производитель, страну происхождения [Пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете в прослеживаемом формате, с четкими разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т.д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: М – выборочное среднее; m – ошибка среднего;  $\sigma$  – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа  $M \pm m$ , указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами, и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т.п.).

## Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

## Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написание рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

### Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования, как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

### Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

### Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

## ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по ал-

фавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

**Не следует ссылаться:** на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

**Следует избегать** ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных, должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

**Недопустимо самоцитирование**, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт [translit.ru](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 psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

#### 2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

#### References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

#### 3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

#### References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

#### 4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

#### 5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.

**В библиографическом описании** каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства, либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

**Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций**

#### Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

#### Образец оформления

Для русскоязычных источников

#### Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

#### References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

#### Образец оформления

Для русскоязычных источников

#### Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

#### References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

**Варианты библиографического описания материалов конференций:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

**Варианты библиографического описания патентов:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

**Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>

#### DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.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. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате \*.tif, \*.jpg, \*.cdr, \*.ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.



## ПГФА – признанный центр фармацевтического образования России

Академия имеет лицензию Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки на право ведения образовательной деятельности в сфере высшего, послевузовского и дополнительного профессионального образования и свидетельство о государственной аккредитации на право выдачи выпускникам, прошедшим итоговую государственную аттестацию, документов об образовании государственного образца.

### ФАРМАЦИЯ / СРЕДНЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

Квалификация: фармацевт (срок обучения 1 год 10 мес.).

При приеме учитывается средний балл аттестата. Ведение фармацевтической деятельности в сфере обращения лекарственных средств (фармацевтическое консультирование, изготовление лекарственных препаратов, розничная реализация и отпуск лекарственных препаратов и других товаров аптечного ассортимента).

### ФАРМАЦИЯ / ВЫСШЕЕ ОБРАЗОВАНИЕ (СПЕЦИАЛИТЕТ)

Квалификация: провизор (срок обучения 5 лет).

ЕГЭ: химия, биология, русский язык.

Обеспечение населения, медицинских и других организаций безопасными, эффективными и качественными лекарственными препаратами, в том числе изготовленными в аптечных организациях, и другими товарами аптечного ассортимента.

### БИОТЕХНОЛОГИЯ / ВЫСШЕЕ ОБРАЗОВАНИЕ (БАКАЛАВРИАТ)

Срок обучения 4 года.

ЕГЭ: русский язык, химия/биология, математика (профильный уровень).

Специалисты по производству биотехнологических продуктов и лекарственных средств.

### ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ / ВЫСШЕЕ ОБРАЗОВАНИЕ (БАКАЛАВРИАТ)

Срок обучения 4 года.

ЕГЭ: русский язык, химия, математика (профильный уровень).

Специалисты в сфере производства готовых лекарственных средств.

**ДЕНЬ ОТКРЫТЫХ ДВЕРЕЙ** проходит в последнюю субботу марта в 11:00 ч. по адресу: г. Пермь, ул. Крупской, д. 46 (лабораторный корпус ПГФА), ауд. 75



По вопросам поступления в Пермскую фармацевтическую академию обращаться:

e-mail: [priem@pfa.ru](mailto:priem@pfa.ru)  
Тел.: +7 (342) 203 37 73



# Факультет дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России

**ПРЕДЛАГАЕТ ПРОВЕСТИ ОБУЧЕНИЕ  
ПО СЛЕДУЮЩИМ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ПРОГРАММАМ:**

## Обучение по дополнительным профессиональным программам профессиональной переподготовки\*:

**Объем:** 504 часа.

**Форма обучения:** заочная с использованием дистанционных технологий, очно-заочная с использованием дистанционных технологий.

**Документ, выдаваемый по окончании обучения:**

- ✓ Диплом о профессиональной переподготовке:
- ✓ «Управление и экономика фармации».
- ✓ «Фармацевтическая технология».
- ✓ «Фармация».

## Обучение по дополнительным профессиональным программам повышения квалификации:

**Объем:** 144 часа.

**Форма обучения:** заочная, очно-заочная с использованием дистанционных технологий.

1. Управление деятельностью фармацевтических организаций (зарегистрирована на портале НМФО).
2. Организация фармацевтической деятельности (зарегистрирована на портале НМФО).
3. Современные аспекты работы фармацевтов (зарегистрирована на портале НМФО).
4. Экономика и управление в фармации.
5. Контроль качества лекарственных средств.

**\*Прием на обучение при наличии фармацевтического стажа от 5 лет.**



**Контакты:**

**e-mail [do@pfa.ru](mailto:do@pfa.ru)**

**Тел.: (342) 238-38-45**