WWW.PHARMJOURNAL.RU

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ
ВАК Scopus®

ГРУППА КОМПАНИЙ
Лабконцепт
100 лет ГОСМЕТР
LABINVENT

НЕЗАМЕНИМЫЕ МЕЛОЧИ
для лаборатории на фармпроизводстве

В НАЛИЧИИ
на складе в СПб

ЭЛЕКТРОННЫЕ ДОЗАТОРЫ
PipetteM и PippetePro SILab



SILAB
Simply Intelligent



СИСТЕМЫ ОЧИСТКИ ВОДЫ
HyperPureX и ZHIANG

HyperPureX
ZHIANG®



ПОСУДОМОЕЧНЫЕ МАШИНЫ
Baye Smart

BAYE SMART

Санкт-Петербург +7 (812) 327-37-00 lc@labconcept.ru labconcept.ru

INFO@PHARMJOURNAL.RU

Том 15, № 1. 2026
Volume 15, No. 1. 2026

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

+7 495 281 81 11
info@cpha.ru
www.cpha.ru
117149, Москва,
Симферопольский бульвар, д. 8

Посетить сайт:



ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ

Сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств

ПОЧЕМУ МЫ?

ЛИДЕР ОТРАСЛИ 2023

СЕРТИФИКАТЫ

Первая в России биоаналитическая лаборатория, сертифицированная по GLP

СОВРЕМЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Все исследования выполняются на современном проверенном оборудовании

ОПЫТ

100+ исследований выполняются ежегодно

ЛУЧШИЕ СПЕЦИАЛИСТЫ

В составе лаборатории работают 30+ сотрудников

WWW.PHARMJOURNAL.RU

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2026. Том 15, № 1

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2026. Volume 15, No. 1

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. – доц., к. фарм. н., директор Института фармации ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Республика Татарстан, Россия

Скорик Ю. А. – доц., к. х. н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН; заведующий научно-исследовательским химико-аналитическим отделом Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова, 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

Арчакова О. А. – к. фарм. н., заведующая ЛБАИ ИЦ ООО «ЦФА», Москва, Россия

Бахрушина Е. О. – д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 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

Бобкова Н. В. – доц., д. фарм. н., профессор кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

Бондарева И. Б. – д. биол. н., профессор кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лулумбы», Москва, Россия

Ваизова О. Е. – доцент, д. м. н., профессор кафедры фармакологии ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

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

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

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

Емшанова С. В. – д. фарм. н., АО «Бинергия»; руководитель отдела разработки, профессор кафедры промышленной фармации НИЯУ МИФИ, Москва, Россия

Зарубина И. В. – профессор, д. биол. н., старший преподаватель, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Министерства обороны Российской Федерации, Москве, 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., доцент, профессор кафедры управления и экономики фармации ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

Комаров Т. Н. – д. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА», Москва, Россия

Крикова А.В. – д. фарм. н., доцент, зав. кафедрой управления и экономики фармации, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, 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

Малашенко Е. А. – к. фарм. н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Медведев Ю. В. – к. фарм. н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

Мельников Е. С. – к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

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

Напалкова С. М. – профессор, д. биол. н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Оборотова Н. А., проф., д. фарм. н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина», Москва, Россия

Ордабаева С. К. – проф., д. фарм. н., заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии АО «Южно-Казахстанская медицинская академия», Шымкент, Казахстан

Пожарицкая О. Н. – к. фарм. н., старший научный сотрудник Мурманского морского биологического института РАН (ММБИ РАН), Мурманск, Россия
Попов В. В. – д. м. н., профессор кафедры терапии с курсом фармации Медицинского института непрерывного образования, ФГБОУВО «РОСБИОТЕХ». Врач – Клинический фармаколог ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» имени Н. А. Семашко», Москва, Россия
Русинов В. Л. – чл. корр. РАН, д. х. н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия
Селиванова И. А. – проф., д. фарм. н., профессор кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия
Сливкин А. И. – проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологи ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия
Смехова И. Е. – доц., профессор кафедры технологии лекарственных форм ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Станишевский Я. М. – проф., д. х. н., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Москва, Россия
Сысуев Б. Б. – доц., д. фарм. н., руководитель Центра фармацевтической разработки и инновационных лек. форм Сеченовского университета, Москва, Россия
Тернинко И. И. – доцент, д. фарм. н., начальник Испытательной лаборатории, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Тринеева О. В. – д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологи ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия
Шиков А. Н. – д. фарм. н., профессор кафедры технологии фармацевтических препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Wrood S. Al-Khfajy (Ирак) – д. фарм. н., Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy. Mustansiriyah University, Багдад, Ирак

ISSN 2305-2066 (Print)	
ISSN 2658-5049 (Online)	
Учредители печатной версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1 **Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)** Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации** Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
Учредители онлайн версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
Издатель	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
Директор журнала	Кульджанова Н. В.
Заведующий редакцией	Михайлова Н. С.
Основан	Журнал издается с ноября 2012 г.
Периодичность	4 выпуска в год
Префикс DOI	10.33380
Адрес редакции	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Россия, 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1 www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Адрес типографии	**ООО «МАКС ПРЕСС»** Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
Копирайт	© Разработка и регистрация лекарственных средств, оформление макета, 2026
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License (cc) BY 4.0
Цена	Свободная

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

Focus and Scope of the journal

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

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

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

The third section describes analytical quality control methods.

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

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

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Vitaliy V. Khutoryanskiy – Prof., Cand. of Sci. (Chem.), University of Reading, Reading, United Kingdom
Rouslan I. Moustafine – as., Cand. of Sci. (Chem.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia
Yury A. Skorik – as., Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds of RAS; Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Editorial board

Yulia I. Ammour – Cand. of Sci. (Biol.), Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia
Olga A. Archakova – Cand. of Sci. (Pharm.), LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Moscow, Russia
Elena O. Bakhrushina – Dr. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
Vladimir L. Beloborodov – Dr. of Sci. (Pharm.), 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
Natalia V. Bobkova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia
Irina B. Bondareva – Dr. of Sci. (Biol.), Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia
Olga E. Vaizova – as., Dr. of Sci. (Med.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia
Konstantin S. Guzev – Dr. of Sci. (Pharm.), Retinoids Pharmaceutical Research and Production Company (Retinoids JSC), Moscow, Russia
Natalia B. Diomina – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
Irina A. Dzhuparova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia
Svetlana V. Emshanova – Dr. of Sci. (Pharm.), JSC "Binergy"; National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia
Irina V. Zarubina – Prof., Dr. of Sci. (Biol.), S. M. Kirov Military Medical Academy, Moscow, Russia
Dmitry Yu. Ivkin – Cand. of Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
Elena I. Kalenikova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Elena V. Karakulova – Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia
Timofey N. Komarov – Dr. of Sci. (Pharm.), LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Moscow, Russia
Anna V. Krikova – Dr. of Sci. (Pharm.), Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia
Vladimir A. Kurkin – Dr. of Sci. (Pharm.), Samara State Medical University, Samara, Russia
Larisa I. Lavrenteva – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia
Evgeniya A. Malashenko – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
Yury V. Medvedev – Cand. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia
Evgeny S. Melnikov – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
Igor I. Miroshnichenko – Dr. of Sci. (Med.), Mental Health Research Center , Moscow, Russia
Svetlana M. Napalkova – Prof., Dr. of Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
Natalia A. Oborotova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), National Medical Research Center for Oncology named after N. N. Blokhin, Moscow, Russia
Saule K. Ordabaeva – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), JSC «South Kazakhstan Medical Academy», Shymkent, Kazakhstan
Olga N. Pozharitskaya – Cand. of Sci. (Pharm.), Murmansk Marine Biological Institute of the RAS, Murmansk, Russia
Vladimir V. Popov – Dr. of Sci. (Med.), Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH). Clinical Hospital "RZD-Medicine" named after N. A. Semashko", Moscow, Russia
Vladimir L. Rusinov – RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia
Irina A. Selivanova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
Aleksei I. Slivkin – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia
Irina E. Smekhova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
Yaroslav M. Stanishevskiy – Prof., Dr. of Sci. (Chem.), Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia
Boris B. Sysuev – as., Dr. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia
Inna I. Terninko – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
Olga V. Trineeva – Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia
Alexander N. Shikov – Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
Wrood S. Al-Khfajy – Dr. of Sci. (Pharm.), Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy. Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq

ISSN 2305-2066 (Print)	
ISSN 2658-5049 (Online)	
Print version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia **I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)** Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia **Siberian State Medical University** Address: 2, Moscowskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia
Publisher	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
Founded:	The journal has been published since November 2012.
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.33380
Editorial office address	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	**LLC "MAX PRESS"** 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, layout design, 2026
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Price	Free

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

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции 10

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Разработка лекарственных средств на основе производных 5-фенилтетразола для фармакологической коррекции метаболитических нарушений
А. Ю. Гришина, Д. В. Антоненко, М. А. Скрыльникова, О. В. Буюклинская, В. Ц. Болотова, В. Е. Кованских, В. А. Островский 30

Сравнение антиоксидантной активности образцов дигидрокверцетина с различным диастереомерным составом
Р. П. Терехов, И. Р. Ильясов, Б. Ли, Ю. Цзэн, Д. И. Панков, А. А. Свотин, В. В. Оличева, Д. Р. Колесникова, В. Ф. Гоман, М. Д. Корочкина, И. А. Селиванова 43

Фармацевтическая технология

Применение подхода «качество через проектирование» (QbD) для разработки состава таблеток пролонгированного действия на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия
Ю. М. Коцур, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич 53

Биофармацевтическая оценка систем контролируемой пероральной доставки индометацина на основе полимер-лекарственного и интерполиэлектролит-лекарственного комплексов
А. Ю. Ситенков, А. В. Ситенкова (Буховец), Ш. Ф. Насибуллин, И. И. Сёмина, Р. И. Мустафин 62

Разработка технологии получения гелей метронидазола с улучшенными биофармацевтическими свойствами на основе полимеров различной природы
М. С. Оленева, В. В. Грих, Т. И. Кунина, М. Ю. Войтко, А. Н. Воронин, К. А. Терских, М. И. Станцов, К. Г. Читанава, С. Р. Нарышкин, И. И. Краснюк (мл.) 73

Разработка состава и технологии таблеток для рассасывания с экстрактом *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak с применением концепции Quality by Design
А. М. Джакиянов, Ч. И. Ридванов, Ж. Н. Исаев, Г. Т. Жумашова, Т. С. Бекежанова, Р. И. Кулманбетов, Е. В. Талгаева, Ж. Ж. Туруспаева, З. Б. Сакипова, М. К. Сулейменов 85

Разработка и практическое применение расчетной модели процесса гранулирования в псевдоожиженном слое
О. А. Зырянов Г. Э. Бркич, Н. В. Пятигорская, Б. Б. Сысуев, М. И. Лавров, Д. А. Мигалев 96

Методы анализа лекарственных средств

Оценка подлинности синюхи голубой травы (*Polemonium caeruleum herba*) по анатомическим признакам
А. С. Чистякова, А. С. Болгов, А. А. Гудкова, Г. Ю. Шестакова, А. И. Сливкин 106

Идентификация и количественное определение стероидного сапогенина диосгенина методом ВЭТСХ в корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino
А. Е. Суханов, В. В. Сепп, К. С. Бакулин, А. Е. Крашенинников, С. В. Убушаев 115

Разработка, валидация и применение методики оценки жизнеспособности *Escherichia coli* с помощью проточной цитометрии
А. С. Казакова, А. Н. Афанасьева, А. А. Еврейская, А. Д. Акино, А. К. Зенкова, В. Б. Сапарова, З. Р. Хасаншина, М. Д. Бочкарева, Р. В. Драй 124

Валидация метода Фолина – Чокальтеу для анализа флоротаннинов в свежих и штормовых выбросах бурых водорослях *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae)
Е. Д. Облучинская, О. Н. Пожарицкая, А. В. Даурцева, А. Н. Шиков 135

Анализ полифторсодержащего аналога нестероидного антиандрогена флутамида методами ядерного магнитного резонанса и жидкостной хроматографии
Н. Е. Кузьмина, С. В. Алешин, С. Л. Кузнецов, И. А. Тубашева, В. Г. Шуватова, М. Б. Сокол, Е. Д. Никольская 146

Разработка и валидация аналитических методик количественного определения дабигатрана этексилата методами ВЭЖХ-ДМД и УФ-спектрофотометрии при проведении теста сравнительной кинетики растворения капсул дабигатрана в биорелевантной среде FaSSGF
Д. М. Девяткина, П. С. Мащенко, А. Д. Внутских, И. О. Девяткин, Н. А. Прозорова, А. В. Фотеева 161

Стандартизация жидких водно-спиртовых извлечений из облепихи крушиновидной листьев
Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева 172

Разработка и валидационная оценка методики спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в плодах и эфирном масле фенхеля обыкновенного
Р. Ш. Хазиев, С. Д. Рюмин, Г. Р. Рамаева, А. В. Немтарев 182

Доклинические и клинические исследования

Коррекция нарушений психоневрологического статуса, возникающих на фоне хронического токсического поражения головного мозга, блокаторами GPCR/cAMP- и JAC/STAT-сигнальных путей
Т. Ю. Полякова, Л. А. Мирошниченко, А. В. Чайковский, М. В. Белоусов, В. И. Агафонов, Г. Н. Зюзьков 192

Адаптация протокола пробы Квика – Пытеля для оценки антитоксической функции печени у мышей
В. А. Приходько, Т. М. Матузок, В. Е. Карев, А. Б. Изотова, С. В. Оковитый 202

Симуляция фармакокинетических параметров препарата тиозонид у пациентов с дефицитом веса на основе популяционной фармакокинетической модели
А. Ю. Савченко, В. Д. Васюков, В. С. Арнаутов, Н. В. Шилова 210

Острая токсичность и фармакокинетические параметры 2-аминопиррола с противоопухолевой активностью
С. С. Зыкова, Ю. Н. Карпенко, С. В. Чащина, Н. М. Игидов, В. Г. Лужанин 220

Сравнительное исследование гепатотропного действия дапаглифлозина и силимарина на модели циклофосфамид-индуцированного поражения печени у крыс
Афра Тиаб Хлаил, Нада Наджи Аль-Шави 227

Юбилей 241

Некролог 242

Исправления 249

CONTENTS

Introduction 10

Research and development of new drug products

Development of medicines based on 5-phenyltetrazole derivatives for the pharmacological correction of metabolic phenomena
Anna Yu. Grishina, Dmitrii V. Antonenko, Mariya A. Skrylnikova, Olga V. Buyuklinskaya, Vera Ts. Bolotova, Vladislav E. Kovanskov, Vladimir A. Ostrovskii 30

Comparison of antioxidant activity of dihydroquercetin samples with different diastereomeric composition
Roman P. Terekhov, Igor R. Ilyasov, Bo Li, Youyan Zeng, Denis I. Pankov, Artem A. Svotin, Vera V. Olicheva, Diana R. Kolesnikova, Valery F. Goman, Maria D. Korochkina, Irina A. Selivanova 43

Pharmaceutical Technology

Application of the quality by design (QbD) approach for the development of composition of extended-release tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate
Yulia M. Kotsur, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narcevich 53

Biopharmaceutical evaluation of oral controlled indomethacin delivery systems based on drug-polymer and drug-interpolyelectrolyte complexes
Alexander Yu. Sitenkov, Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets), Shamil F. Nasibullin, Irina I. Semina, Rouslan I. Moustafine 62

Development of compositions and technology for obtaining metronidazole gels based on polymers of various nature
Maria S. Oleneva, Victoria V. Grikh, Tatiana I. Kunina, Maria Yu. Voitko, Andrey N. Voronin, Kirill A. Terskikh, Maxim I. Stantsov, Kristina G. Chitanava, Savva R. Naryshkin, Ivan I. Krasnyuk (Jr.) 73

Development of the formulation and manufacturing process of lozenges with *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak dry extract using the Quality by Design concept
Amangeldy M. Jakiyanov, Chakho I. Ridvanov, Zhanpeis N. Issayev, Gulsim T. Zhumashova, Tolkyn S. Bekezhanova, Ruslan I. Kulmanbetov, Yelizaveta V. Talgayeva, Zhanel Zh. Turuspayeva, Zuriyadda B. Sakipova, Marat K. Suleimenov 85

Development and practical application of a computational model of the pelletizing process in a fluidized bed
Oleg A. Zyryanov, Galina E. Brkich, Natalia V. Pyatigorskaya, Boris B. Sysuev, Mstislav I. Lavrov Daniil A. Migalev 96

Analytical Methods

Assessment of the authenticity of Jacob's ladder herb (*Polemonium caeruleum herba*) by anatomical characteristics
Anna S. Chistyakova, Alexey S. Bolgov, Alevtina A. Gudkova, Galina Yu. Shestakova, Alexey I. Slivkin 106

Identification and quantification of the steroidal sapogenin diosgenin by HPTLC in rhizomes with roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino
Anton E. Sukhanov, Vladislav V. Sepp, Konstantin S. Bakulin, Anatoliy E. Krasheninnikov, Sandji V. Ubushaev 115

Development, validation, and application of a method for assessing the viability of *Escherichia coli* for flow cytometry
Anna S. Kazakova, Alina N. Afanaseva, Anastasia A. Evreiskaya, Artur D. Akino, Arina K. Zenkova, Valeria B. Saparova, Zukhra R. Khasanshina, Maria D. Bochkareva, Roman V. Drai 124

Validation of Folin – Ciocalteu assay for phlorotannins analysis in fresh and storm-cast brown algae *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae)
Ekaterina D. Obluchinskaya, Olga N. Pozharitskaya, Anna V. Daurtseva, Alexander N. Shikov 135

Analysis of a polyfluorinated analogue of the nonsteroidal antiandrogen flutamide by nuclear magnetic resonance and liquid chromatography
Natal'ya E. Kuz'mina, Sergey V. Aleshin, Sergey L. Kuznetsov, Irina A. Tubasheva, Valentina G. Shuvatova, Maria B. Sokol, Elena D. Nikolskaya 146

The development and validation of analytical methods for the quantitative determination of dabigatran etexilate by HPLC-DAD and UV spectrophotometry during a comparative dissolution kinetics test of dabigatran capsules in the biorelevant FaSSGF medium
Daria M. Devyatkina, Petr S. Mashchenko, Alena D. Vnutskikh, Igor O. Devyatkin, Nadezhda A. Prozorova, Alexandra V. Foteeva 161

Standardization of liquid aqueous-alcoholic extracts from sea buckthorn leaves
Nataliya A. Kovaleva, Olga V. Trineeva 172

Development and validation evaluation of a technique for the spectrophotometric determination of the amount of aromatic compounds in fruits and essential oil of fennel
Ramil' Sh. Khaziev, Sergey D. Ryumin, Gel'fiya R. Ramaeva, Andrey V. Nemtarev 182

Preclinical and clinical study

Correction of psychoneurological disorders arising against the background of chronic toxic brain damage with inhibitors of GPCR/cAMP and JAC/STAT signaling pathways
Tatiana Yu. Polyakova, Larisa A. Miroshnichenko, Alexander V. Chaikovskii, Mikhail V. Belousov, Vladimir I. Agafonov, Gleb N. Zyuz'kov 192

Adaptation of the Quick – Pytel test protocol for the assessment of liver antitoxic function in mice
Veronika A. Prikhodko, Tatyana M. Matuzok, Vadim E. Karev, Anna B. Izotova, Sergey V. Okovityi 202

Simulation of pharmacokinetic parameters of thiozonide in patients with low body weight based on a population pharmacokinetic model
Alla Yu. Savchenko, Vladislav D. Vasyukov, Vladimir S. Arnautov, Natalia V. Shilova 210

Acute toxicity and pharmacokinetic parameters of 2-aminopyrrole with antitumour activity
Svetlana S. Zykova, Yulia N. Karpenko, Svetlana V. Chaschina, Nazim M. Igidov, Vladimir G. Luzhanin 220

Comparative Hepatoprotective Effects of Dapagliflozin to Silymarin Against Cyclophosphamide-Induced Liver Injury in Rats: Biochemical, Antioxidants and Histopathological Studies
Afrah Thiab Hlail, Nada Naji Al-Shawi 227

Anniversary 241

Obituary 242

Erratums 249

Редакционная статья / Editorial article

XIX конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Двухдневный XIX конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» прошел 17 и 18 февраля 2026 года в конгресс-центре Сеченовского университета в Москве.

XIX Congress "Drug development & registration"

The two-day XIX Congress "Drug development and registration" was held on February 17 and 18, 2026, at the Sechenov University Congress Center in Moscow.



Организаторами конгресса выступают Центр Фармацевтической Аналитики, журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», журнал «Гербариум» и Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет.

Мероприятие посетили порядка 200+ слушателей, с нами были более 95 докладчиков, нас поддержали 20+ партнеров.

Докладчики конгресса – топ-менеджеры крупных фармацевтических компаний, представители государственных органов власти, научных организаций, а также отраслевых ассоциаций и инвестиционных фондов.

Открывала мероприятие **Наталья Вячеславовна Кульджанова**, директор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», руководитель пресс-службы Центра Фармацевтической Аналитики. *«Мы рады, что каждый год в этом зале собираются профессионалы, определяющие будущее фармацевтики. Это ученые, разработчики, эксперты в области исследований, регистрации и регуляторики. 19-й конгресс – не просто цифра, а показатель важности диалога между всеми участниками отрасли, свидетельство того, что мы вместе с вами постоянно движемся вперед, вслед за стремительно меняющимся миром.*

Желаем всем участникам эффективной работы, живых дискуссий, смелых гипотез и профессиональных открытий. Пусть каждый день конгресса приносит новые идеи и знакомства.», – отметила **Наталья Вячеславовна**.

В качестве почетного гостя конгресса выступил директор ФБУ «ГИЛС и НП» **Шестаков Владислав Николаевич**. Владислав Николаевич выразил уверенность в том, что за годы работы конгресс зарекомендовал себя как авторитетная площадка для междисциплинарного обсуждения вопросов разработки и регистрации лекарственных средств. *«Особую ценность диалог приобретает сегодня – в период масштабной трансформации отрасли, когда необходимо наращивать компетенции и отвечать на растущие запросы по созданию и выводу на рынок*



Игорь Евгеньевич Шохин



Наталья Вячеславовна Кульджанова

инновационных отечественных разработок. Ключевыми факторами успеха остаются опора на научные институты, промышленное производство и передовую лабораторно-клиническую базу. При этом регуляторная система также должна непрерывно совершенствоваться, не отставая от динамики изменений.», – отметил в своей приветственной речи **Владислав Николаевич**.

На открытии XIX конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» с приветственным словом выступил также ректор Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета **Игорь Анатольевич Наркевич**. **Игорь Анатольевич** отметил, что в центре внимания конгресса – разработка (оригинальных и воспроизведенных) лекарственных препаратов, доклинические и клинические исследования, технологии производства и регуляторные вопросы. А знания и опыт, накопленные участниками, станут основой для плодотворных дискуссий и новых идей.

Сысуев Борис Борисович, д. фарм. н., профессор, Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М. В. Ломоносова, выступил с темой доклада:



Владислав Николаевич Шестаков

«Учебный центр ЦФА: подготовка кадров как современный тренд для будущего отечественной фармы». В своем докладе он отметил, что технологические изменения на рынке привели к разрыву между ожиданиями и реальностью. Это связано с переходом к формату 4.0, развитием искусственного интеллекта, больших данных и умных технологий, а также динамическим обновлением стандартов GMP, EAS и других. Главная причина проблемы – недостаточное образование. Новые сотрудники приходят на работу с минимальным набором навыков из-за базовых учебных программ и устаревшей материальной базы. Корпоративное обучение часто формальное и не ориентировано на конкретные цели. Сотрудники не понимают, как обучение связано с их карьерой, что снижает мотивацию. Последствия для бизнеса – финансовые потери, репутационные риски и угроза технологическому суверенитету.

Борис Борисович представил новую модель обучения на базе ООО «ЦФА». Отметил, что Центр предлагает решение проблемы через экосистему обучения для сотрудников фармпроизводства и регуляторных отделов. Мы создаем замкнутый цикл развития компетенций, чтобы сотрудники могли совершенствовать свои навыки в течение рабочего процесса. Мы оцениваем потребности в компетенциях и предлагаем микрообучение на основе ключевых навыков: практика и реагирование на реальные кейсы и процессы. Обучение проводится в определенный момент: при запуске нового продукта, аудите или возникновении отклонений. Все материалы персонализированы для каждого сотрудника.

Деловая программа этого года отличалась высокой насыщенностью и разнообразием. В течение двух дней участники конгресса обсудили современные тенденции и перспективы клинических и доклинических исследований, регистрацию лекарственных средств и регуляторные вопросы действующего законодательства ЕАЭС, регистрационные исследова-

ния лекарственных средств: от лаборатории до досье. Кроме того, поговорили про препараты клеточной и генной терапии, мРНК-платформы и онколитические препараты, трансформирующие требования к GxP. В фокусе внимания были секции, посвященные единому рынку ЕАЭС – регистрация ЛС и регуляторные вопросы действующего законодательства, QbD, доставке и дизайну лекарств нового поколения, качеству лекарственных средств на этапах жизненного цикла, а также разработке, регистрации, производству и изготовлению РФЛП. Вместе мы ответили на вопрос, из каких компонентов складывается качественное доклиническое исследование? Отдельная дискуссия была посвящена тому, как биостатистика превращает цифры в решения о судьбе лекарственного средства, а также разработке и исследованиям биотехнологических лекарственных средств. В рамках конгресса проводились мастер-классы по ТСКР и надлежащей публикационной практике. Впервые состоялся мастер-класс «Оптимизация разработки ТЛФ на основе анализа взаимосвязи между растворением и проницаемостью действующего вещества» от ведущего научного консультанта компании Electrolab India Pvt. Ltd. Наравне с ведущими экспертами отрасли в рамках конгресса с докладами о своих разработках впервые выступили молодые ученые и специалисты.

Открывала мероприятие флагманская секция конгресса – *«Регистрационные исследования лекарственных средств: от лаборатории до досье»*. Модераторами секции выступили **Комаров Тимофей Николаевич**, д. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА», и **Щелгачева Дана Салаватовна**, и. о. заведующего лабораторией биоаналитических исследований ООО «ЦФА».

В рамках секции мы обсудили критически важные лабораторные этапы в процессе регистрации лекарственных средств. Кроме того, мы рассмотрели актуальные регуляторные требования и поделились практическими подходами к организации и проведению исследований, результаты которых формируют ключевые разделы регистрационного досье.

В первой части пленарной сессии **Алпатова Наталья Александровна**, д. б. н., главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в своем докладе рассмотрела особенности оценки биологических свойств биотехнологических лекарственных препаратов (белки, моноклональные антитела, конъюгаты), которые отличаются сложной структурой и высокой специфичностью действия. Ключевые особенности и подходы к изучению:

- ✓ Специфика анализа: Из-за сложности молекул и их видовой специфичности требуется особый подход к доклиническим исследованиям (фармакодинамика, токсичность, иммуногенность).
- ✓ Функциональность антител: Оценка моноклональных антител включает изучение связывания с антигеном и эффекторных функций, включая взаимодействие с рецепторами иммунных клеток и системой комплемента. Важную роль играет анализ гликозилирования.
- ✓ Цель исследований: Установить четкую связь между биологической активностью препарата и его клиническим эффектом для обеспечения эффективности и безопасности.

Изучение биологических свойств критически важно на всех этапах жизненного цикла препарата – от разработки и подтверждения биоподобия до пострегистрационного мониторинга. Это фундамент, обеспечивающий эффективность и безопасность терапии.

Еременко Наталья Николаевна, заместитель начальника управления экспертизы № 1 по эффективности и безопасности лекарственных средств Центра экспертизы и контроля ГЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России выступила с докладом о сравнительной кинетики растворения лекарственных препаратов в рамках Решения № 93 «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» от 26 нояб-







ря 2025 г. **Наталья Николаевна** акцентировала внимание на новых требованиях к проведению теста сравнительной кинетики растворения при внесении изменений в регистрационное досье лекарственных средств, установленных решением № 93, вступившим в силу 26 декабря 2025 года. Ключевые изменения и область применения:

- ✓ Основание: Новое решение № 93 (дополнение 5) обязывает проводить тест сравнительной кинетики растворения в пострегистрационный период при изменениях в досье.
- ✓ Причины для исследований: Тест требуется при изменениях, касающихся активной фармацевтической субстанции: смена производителя, новый способ синтеза, внесение новой производственной площадки или отсутствие мастер-файла.
- ✓ Цель: Подтверждение постоянства технологического процесса и устранение сомнений в качестве препарата после внесенных изменений.
- ✓ Регламент: В новых правилах четко прописано необходимое количество серий для тестирования, что является частым запросом при подаче документов.

С вступлением в силу решения № 93 перечень ситуаций, требующих проведения теста сравнительной кинетики растворения, расширен. Теперь это обязательный инструмент для подтверждения качества и эквивалентности препарата при пострегистрационных изменениях, особенно связанных с производством активной субстанции.

Параг Гадкари, ведущий научный консультант компании Electrolab India Pvt. Ltd, выступил с темой доклада: «Отклонение результатов растворения за пределы установленных спецификаций как критический показатель качества при разработке ЛС». **Параг Гадкари** подробно рассказал о результатах, выходящих за пределы спецификации (OOS) при проведении теста растворение, которые являются важным сигналом о возможных проблемах в разработке лекарственного средства. Однако такие отклонения часто воспринимаются как аналитические ошибки, на практике они могут быть вызваны иными факторами – например, неправильной установкой валов, загрязнением оборудования или нарушением стандартной процедуры ввода образца. Именно поэтому регуляторные органы, такие как FDA, MHRA и PIC/S, требуют обязательного расследования любого результата вне спецификаций. Ключевая задача – не просто устранить последствия, а предотвратить саму возможность возникновения отклонений.

Современные решения позволяют автоматизировать контроль параметров перед началом теста, снижая зависимость от человеческого фактора и обеспечивая воспроизводимость результатов на уровне, необходимом для успешной разработки и регистрации лекарственных средств.

С докладами выступили также специалисты ООО «Центр Фармацевтической Аналитики». **Попова Мария Олеговна**, руководитель отдела обеспечения качества ООО «ЦФА», затронула вопрос единого окна – нулевые сбои: управление субподрядчиками в комплексных исследованиях. **Карнакова Полина Константиновна**, старший химик-аналитик лаборатории биоаналитических исследований ООО «ЦФА», поделилась практическим опытом проведения биоаналитических исследований на ранних фазах клинических исследований. **Щелгачева Дана Салаватовна**, и. о. заведующего лабораторией биоаналитических исследований ООО «ЦФА», уделила внимание теме биоаналитических исследований инсулинов: критическая оценка подходов и разбор практических аспектов. **Комаров Тимофей Николаевич**, д. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА», подробно рассказал об особенностях проведения биоаналитических исследований отдельных групп лекарственных средств. **Багаева Наталья Сергеевна**, руководитель отдела биостатистики ООО «ЦФА», и **Шохин Игорь Евгеньевич**, д. фарм. н., генеральный директор ООО «ЦФА», рассказали об эволюции методов оценки высвобождения в условиях *in vitro* и предсказание биоэквивалентности, а также ответили на вопрос, где мы находимся сейчас?

Благодарим участников конгресса за интерес к нашему мероприятию, активное участие в дискуссиях и отличное настроение!

Эксклюзивный партнер XIX конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» – ООО «АИКС ЛАБ».

Премиум-партнеры: ООО ТК «Элемент», ООО «Е-лаб».

Также партнерами выступили: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ЕЭК, Евразийская академия надлежащих практик, «Лабконцепт», «ГЕРОФАРМ», «Статэндокс», «Ифарма», ZM CRO GROUP, Р-конф, Дом Фармации, «Лаб Нео», «Фармацевтический вестник», ГУП ЛНР «Лугмедфарм», «БиоЛайн», CON-PHARM. RU, MEDIA MEDICA, AptekaMos.ru, «Московские аптеки», «БелкиАнтитела», ДИАЭМ, «ФармМедПром», PCR. NEWS, NPJ, Университет «Сириус», «Фарма РФ», «Воды здоровья».

До новых встреч на наших новых мероприятиях!

Следите за нашими новостями на:

Сайт журнала РРЛС **Телеграм-канал журнала**

Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

В рамках проекта «Мнение лидеров» состоялся открытый диалог двух экспертов фармацевтической отрасли. Игорь Евгеньевич Шохин, генеральный директор «Центра Фармацевтической Аналитики», обсудил с доктором фармацевтических наук, профессором МГУ Борисом Борисовичем Сысуевым ключевые принципы работы учебного центра «ЦФА». Эксперты поговорили о том, как выстроить эффективное обучение для профессионалов отрасли.

The interview as part of the "Leadership Opinion" Series

As part of the "Leadership Opinion" project, an open dialogue between two pharmaceutical industry experts took place. Igor E. Shohin, CEO of the LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", discussed the key operating principles of the LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" training center with Boris B. Sysuev, Doctor of Pharmaceutical Sciences and Professor at Moscow State University. The experts discussed how to build effective training for industry professionals.



Представляем новый выпуск из цикла «Мнение лидеров». Качественное обучение для фармацевтических специалистов требует особого подхода. Поверхностные вебинары уже не удовлетворяют запросы профессионалов, которым нужна глубина и конкретика.

Учебный центр строит образование на трех принципах:

- ✓ Переосмысление опыта: известные знания обретают новую форму благодаря спикерам-практикам.
- ✓ Актуальность: программы быстро адаптируются под изменения ЕЭК и GMP, где пауза в обучении равна карьерному риску.
- ✓ Погружение вместо информации: детальный разбор нормативной документации, кейсов и совместная работа с экспертом.

Государственная лицензия подтверждает качество и служит «мостиком доверия» при аудитах. Короткие циклы (3–4 дня) позволяют учиться без отрыва

от производства, а разбор реальных ситуаций дает специалисту готовые рабочие инструменты.

Игорь Евгеньевич: ***Борис Борисович, большинство ваших слушателей – это уже состоявшиеся специалисты с опытом. Как вам удается делать программы полезными и новыми для них, учитывая их практическую базу?***

Борис Борисович: В данном случае мы не изобретаем что-то новое. Наоборот, мы берем уже известные специалистам знания и представляем их в новом формате. В этом формате мы приглашаем высококлассных спикеров, выбираем актуальные темы и делаем акцент на практическую пользу. Благодаря такой комбинации наши слушатели получают новый объем знаний, который они искали. Мы понимаем, что удивить опытного специалиста непросто, но в нашем центре это возможно.

Игорь Евгеньевич: ***Можно ли назвать обучающие курсы в нашем Учебном центре «инвестицией в карьеру»?***

Борис Борисович: Современный мир стремительно меняется. То, что сегодня кажется важным, завтра может устареть. Поэтому необходимы новые инвестиции в повышение квалификации. Перерыв в профессиональной деятельности – это как молодой специалист: своего рода стресс-тест для работодателей.

Игорь Евгеньевич: ***В мире много онлайн-курсов. В чем, на ваш взгляд, ключевое отличие профессионального образования в учебном центре от онлайн вебинаров?***

Борис Борисович: Онлайн-вебинары – это способ быстро передать информацию слушателю. Мы же предлагаем более глубокое погружение в тему. Наши спикеры помогут разобраться в новой информации и объяснят нормативные и практические аспекты.

Игорь Евгеньевич: ***Как программы центра адаптируются к быстро меняющимся требованиям рынка, включая требования Евразийской экономической комиссии (ЕЭК)?***

Борис Борисович: Наш центр постоянно отслеживает тенденции рынка, поэтому наши знания всегда соответствуют современным требованиям. Специалисты центра адаптируют и проверяют информацию, чтобы она была актуальной. Это важно, так как рынок ЕС меняется быстро. В прошлом году действовали одни требования, а сейчас появляются новые. Поэтому важна проверка нашими экспертами. В итоге мы предлагаем актуальный продукт. Наша программа пользуется спросом среди профессионалов. Мы быстро адаптируем ее, когда появляются новые знания или требования у регулятора или на рынке.

Игорь Евгеньевич: ***Для многих специалистов критически важно официальное подтверждение их квалификации. Почему наличие государственной лицензии у учебного центра – это не просто формальность, а основа доверия для слушателя и его работодателя?***

Борис Борисович: Все просто. В нашей стране есть документ, который регулирует профессиональную деятельность любого фармацевтического производства. Это решение № 77 об утверждении правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза. Все знают об этом документе. В главе 2 прямо говорится, что качество производства лекарств зависит от персонала.

Из этого следует, что квалификация специалиста важна как для самого работника, так и для работодателя. В нашем случае лицензия – это мостик между учебным центром, персоналом и работодателем. Наличие государственной лицензии гарантирует, что мы предъявляем высокие требования к себе и транслируем их для обучающихся. Они могут подтвердить свою квалификацию при получении удостоверения.

Игорь Евгеньевич: ***Как документы, которые получают выпускники (дипломы/удостоверения), помогают при прохождении аттестаций, аудитов, например, по надлежащей производственной практике?***

Борис Борисович: Наша программа помогает слушателям постоянно совершенствовать профессиональные знания. Это позволяет им успешно проходить как внутренние, так и внешние аудиты. Они могут общаться с коллегами из других компаний на равных. Так они демонстрируют свой профессионализм и подтверждают ценность нашего обучения.

Наши выпускники, получая и закрепляя знания, становятся высококвалифицированными специалистами. Их удостоверения подтверждают высокий уровень компетенции.

Игорь Евгеньевич: ***Спасибо за ответ, Борис Борисович. На Ваш взгляд, какие навыки и знания сегодня особенно важны для специалиста, чтобы он оставался востребованным в будущем, учитывая меняющиеся условия рынка?***

Борис Борисович: Важно поддерживать свои знания в актуальном состоянии. Мы не можем не согласиться с этим, потому что знания сейчас меняются очень быстро. Специалисту необходимо постоянно учиться: проходить курсы повышения квалификации, изучать информацию из разных источников. Это могут быть телеграм-каналы, сайты организаций – все, что помогает быть в курсе последних тенденций и оставаться профессионалом высокого уровня и, соответственно, быть практикующим специалистом и специалистом с большой буквы.

Игорь Евгеньевич: ***В чем особенность Вашей программы обучения для учебного центра ООО «ЦФА»? Если сравнивать с другими центрами, что является вашей уникальной чертой – авторские методики, баланс теории и практики, состав преподавателей? Поделитесь, пожалуйста.***

Борис Борисович: Наш фирменный стиль – это привлечение высококлассных спикеров с уникальными знаниями. Эти специалисты находят баланс между теорией и практикой, что важно для современных профессионалов. Обучаясь у нас, многие понимают ценность этого подхода.

Наш график обучения построен так, чтобы не сбивать рабочий ритм слушателей, что ценится и работниками, и работодателями. Мы проводим короткие циклы, обычно не более 3–4 дней. Это позволяет быстро получать знания, не отвлекаясь от работы. Работодатели видят в этом преимущество, так как сотрудник сохраняет продуктивность.

Важно отметить гибкость обучения: удобное время начала, адаптивный график. Это помогает слушателям совмещать учебу с работой.

Игорь Евгеньевич: ***И последний вопрос. Расскажите, пожалуйста, как устроен практический компонент обучения?***

Борис Борисович: Мы уже в процессе нашего общения несколько коснулись этих моментов. В современном мире обучение играет важную роль, поэтому мы уделяем этому аспекту особое внимание. Наши курсы уникальны благодаря сочетанию практического и теоретического компонентов, а также живому общению со спикерами.

Обучение начинается с практико-ориентированных кейсов, основанных на опыте наших экспертов и самих слушателей. Участники могут предлагать свои кейсы, что делает процесс интерактивным и позволяет разбирать реальные ситуации.

Мы также предлагаем интерактивное общение со спикерами в формате «вопрос-ответ». Это дает слушателям возможность получить развернутые ответы на интересующие их вопросы.

Для повышения квалификации мы используем видеозаписи технологических и аналитических процессов. Это позволяет получить более подробную информацию о применении оборудования и технологий.

Таким образом, наши курсы предоставляют максимальный объем знаний, полезных для дальнейшей работы.

Игорь Евгеньевич: ***Борис Борисович, большое спасибо за интервью.***

Редакционная статья / Editorial article

УДК 615.014.22

Работа химико-фармацевтической промышленности в годы Великой Отечественной войны (1941–1943 гг.)

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

В статье представлена стенограмма доклада главного инженера Главхимфармпрома Д. М. Фрайштата «О положении с производством лекарственных препаратов». Доклад был представлен 31 июля 1943 года на заседании Фармакологического комитета Ученого медицинского совета Наркомздрава Союза ССР. В докладе перечислены потери, которые понесла отечественная химико-фармацевтическая промышленность в первые месяцы войны, и ее состояние к середине 1943 года. Подробно перечислены лекарственные средства, выпуск которых уже налажен на восстановленных и заново построенных предприятиях отрасли. Отмечены трудности, влияющие на рост производства лекарств, озвучены планы по введению новых производств, призванных не только увеличить выпуск традиционного ассортимента лекарственных средств, но и освоить выработку новых препаратов. Основной доклад дополнили представители Главмедфармпрома и Главного аптечного управления. Основное внимание они обратили на планы работы в 1944 году. Материалы совещания планируется представить на конференции фармакологов, терапевтов, представителей товаропроводящей цепи и представителей промышленных организаций для планирования дальнейших действий промышленности в направлении как увеличения ассортимента выпускаемых лекарственных препаратов, так и роста их тоннажного производства.

The chemical and pharmaceutical industry's work during the Great Patriotic War (1941–1943)

Konstantin S. Guzev✉

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

✉ **Corresponding author:** Konstantin S. Guzev. **E-mail:** guzev3@yandex.ru

Abstract

The article presents a transcript of the report by D. M. Freistat, Chief Engineer of Glavchimfarmprom, "On the Situation with the Production of Medicines". The report was presented on July 31, 1943, at a meeting of the Pharmacological Committee of the Scientific Medical Council of the People's Commissariat of Health of the USSR. The report lists the losses incurred by the domestic chemical and pharmaceutical industry in the first months of the war and its state by mid-1943. The list includes details of the medicines that have already been produced at the restored and newly built enterprises of the industry. The difficulties affecting the growth of medicine production were noted, and plans were announced for the introduction of new production facilities that would not only increase the production of traditional medicines, but also enable the development of new drugs. The main report was supplemented by representatives of Glavmedfarmprom and the Main Pharmacy Administration. They focused on the plans for 1944. The meeting's materials were planned to be presented at a conference of pharmacologists, therapists, representatives of the distribution chain, and representatives of industrial organizations to plan further actions by the industry to increase both the range of manufactured drugs and their tonnage production.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на тяжелейшее положение Советского Союза в годы Великой Отечественной войны (ВОВ), его химико-фармацевтическая промышленность (ХФП) продолжала свою работу, не останавливаясь ни на день. Снабжение медикаментами армии было ее основной задачей. Сегодня найти какую-либо информацию о работе этой отрасли народного хозяйства сложно, так как она опубликована в кратких сообщениях в специализированных журналах времен войны. Она представлена очень отрывочно, особенно о начальном периоде ВОВ, и не позволяет в полной мере оценить стоящие перед отраслью трудности. Поэтому мы вынуждены были обратиться к другим источникам. Этим источником оказались протоколы заседаний Фармакологического комитета Ученого медицинского совета Наркомздрава Союза ССР (ФК) за

1943 год, где на одном из заседаний был рассмотрен вопрос о реальном состоянии ХФП с участием постоянных членов ФК и приглашенных представителей промышленности и Главного аптекоуправления. Заседание Комитета состоялось летом 1943 года в переломный момент войны. Основной докладчик представил полный и структурированный анализ ситуации в ХФП, начиная с потерь в начале войны, до момента подъема производства лекарственных препаратов в ее кульминационной точке, а также обозначил планы дальнейшего развития отрасли. Важно, что основной доклад дополнили представители Главмедфармпрома и Главного аптекоуправления. Таким образом, разговор профессионалов от фармацевтической промышленности с профессионалами от медицины позволил воссоздать полную картину реальной ситуации с лекарственным обеспечением Красной Армии и мирного населения. Однако спланировать дальнейшие действия промышленности в направлении как увеличения ассортимента выпускаемых лекарственных препаратов, так и роста их тоннажного производства можно было только по результатам совместной работы фармакологов, терапевтов, представителей товаропроводящей цепи и представителей промышленных организаций на специальной конференции, проведение которой планировалось в 1944 году.

Ниже мы приводим содержание доклада. Можно было, конечно, привести некоторый его пересказ, но мы посчитали, что целесообразно представить его полную стенограмму, сохранив авторский стиль, подчеркивающий серьезность момента.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Доклад «О положении с производством лекарственных препаратов» был представлен 31 июля 1943 года главным инженером Главхимфармпрома Давидом Моисеевичем Фрайштатом (Протокол № 11 от 31.07.1943 г.). Этот доклад представил председатель ФК проф. А. В. Рахманов. Он сказал: «Основной вопрос, который мы должны сегодня прослушать, – это доклад промышленности относительно положения с производством лекарственных препаратов. Я несколько разъясню, как этот вопрос сейчас стоит, для того, чтобы было ясно, для чего мы это делаем и что мы будем делать дальше в этом направлении. Ученый медицинский совет ждет от нас доклада относительно того, какие препараты из сейчас производящихся могут быть сняты с производства для освобождения технических мощностей и, наоборот, какие препараты из вновь нами одобренных необходимо ввести в производство как обязательные; какие перспективы дальше перед нами стоят в смысле лекарственного снабжения, потому что, как известно, у нас в этом отношении существуют некоторые затруднения.

Для того, чтобы наше мнение было обосновано и правильно, мы решили пойти по такому пути: сначала ознакомиться с положением производства, с положением в нашей промышленности, ее возможностями на сегодня и ее перспективами на завтра. Сегодня мы начнем с того, что прослушаем доклады главных источников нашего снабжения.

Понятно, что есть такие препараты, производство которых просто и не встречает особых затруднений, но есть такие препараты, которые требуют определенного оборудования, определенных площадей, определенного сырья. Все эти обстоятельства – производственные и сырьевые возможности – должны быть нами выяснены. Я совершенно ясно отдаю себе отчет в том, что сегодня после того, как заслушаем доклад, мы не сможем сделать окончательных выводов хотя бы потому, что организации НКЗдрава являются не единственными производящими организациями, а с другой стороны, потому, что вопрос этот настолько сложен, что придется и в дальнейшем значительно поработать над ним».

Главный инженер Главхимфармпрома Д. М. Фрайштат сообщил:

«ХФП вышла перед войной, можно сказать, на широкую дорогу, и ассортимент выпускаемых ею препаратов значительно расширился. Тоннаж этих препаратов тоже был на довольно высоком уровне. Разразившаяся война очень резко отразилась на работе промышленности. ХФП потеряла заводы, находившиеся на Украине, – Киевский и Харьковский. Заводы, которые были расположены в Москве, были частично, а некоторые в значительной мере эвакуированы. Таким образом, в начале 1942 года налаженной работы в промышленности не было и быть не могло. Можно сказать, что промышленности не было.

Конец 1941 года, весь 1942 год и первая половина 1943 года явились в основном периодом создания заново химико-фармацевтических заводов на востоке. Все то оборудование, которое удалось эвакуировать с московских и украинских предприятий, начало восстанавливаться в виде заводов и в виде отдельных заводских цехов на востоке. Сегодня мы имеем на востоке 8 новых заводов, выпускающих медикаменты. Одновременно с этим шло восстановление московских заводов, и сейчас все наши предприятия – 10 предприятий мы насчитываем в Москве и Московской области – если не полностью, то в значительной степени восстановлены.

Отсутствие подходящих производственных площадей для организации химического производства на восточной базе и отсутствие оборудования для восстановления производства на московских заводах ограничивало возможности Главхимфармпрома в части восстановления производства всей номенклатуры препаратов, которую ХФП вырабатывала до войны. Если отбросить то значительное количество препаратов, которое ХФП производила, но которое относится к лекарственным средствам, реактивам и целому ряду химических препаратов, то всего до войны промышленность выпускала 153 медикамен-

тозных препарата. В настоящее время ХФП восстановила производство 85 препаратов (более 55 %). В их числе 15 новых препаратов, которые до войны не вырабатывались совершенно. Восстановлено производство 76 препаратов, сняты с производства на наших заводах или переданы заводам других наркоматов 9 препаратов, из них 6 эндокринных препаратов должны выпускаться в системе Наркомата мясной и молочной промышленности – по месту нахождения основного сырья. Три препарата серебра переданы Главмедфармпрому.

Восстановление нашей промышленности в 1941–42 годах и развитие производства медикаментов шло главным образом в направлении удовлетворения потребности Красной Армии и гражданского населения в наиболее важных препаратах. В первую очередь – сульфаниламидных препаратах, препаратах висмута и ртути, салициловых препаратах, йоде, анестезирующих и других.

Несмотря на то, что мы не восстановили полностью весь ассортимент, по некоторым главнейшим и важным средствам мы производим их в значительно большем количестве, чем выпускали до войны. Если сравнить II квартал 1942 года со II кварталом 1943 года, получаются следующие цифры роста: по аскорбиновой кислоте – на 700 %, по натрию лимоннокислому – на 1000 %, по салолу – на 248 %, по сульфицину – на 720 % и другим. Как видно, это относится в первую очередь к препаратам, в которых особо нуждается Красная Армия.

Ниже мы приводим в виде таблицы некоторые конкретные результаты по восстановлению работы ХФП к лету 1943 года, указанные в докладе (таблица 1).

Несмотря на значительный рост выпуска препаратов как по номенклатуре, так и по их количеству в сравнении с 1942 годом, а также значительное увеличение выпуска отдельных важнейших средств, все же промышленность недостаточно удовлетворяет потребности армии и населения. Особенная дефицитность в препаратах наблюдалась в I квартале 1943 года, что вызвано недоснабжением нашей промышленности основными видами сырья: ацетанилидом, висмутом металлическим, уксусным ангидридом и целым рядом других важнейших компонентов.

Таблица 1. Итоги работы химико-фармацевтической промышленности по восстановлению производственных мощностей к лету 1943 года

Table 1. Results of the chemical and pharmaceutical industry's efforts to restore production capacity by the summer of 1943

№	Фармакологическая группа Pharmacological group	Производство до 1940 года Production before 1940	Восстановлено производство к лету 1943 года Production was restored by the summer of 1943	Примечание Note
1	Анестезирующие препараты Anesthetic drugs	19	7	–
2	Антисептические препараты Antiseptic drugs	8	2	Из 8 препаратов этой группы, которые раньше выпускались, остались только 2 – риванол и уротропин. Остальные в 1943 году не производятся. Калий уксуснокислый не восстановлен, уротропин вырабатываем как и раньше. Меркузал и кальций уксуснокислый не восстановлены Of the eight drugs in this group previously produced, only two remain: rivanol and urotropin. The others were discontinued in 1943. Potassium acetate has not been restored, but urotropin is still being produced. Mercuzal and calcium acetate have not been restored
3	Бактерицидные препараты Bactericidal drugs	4	1	Серебряные препараты переданы для производства Главмедфармпрому Silver preparations have been transferred to Glavmedfarmprom for production
4	Болеутоляющие препараты Painkillers	4	4	Хлороформ, папаверин, морфий солянокислый – этот ассортимент сохранен Chloroform, papaverine, morphine hydrochloride – this range has been preserved

Продолжение таблицы 1

№	Фармакологическая группа Pharmacological group	Производство до 1940 года Production before 1940	Восстановлено производство к лету 1943 года Production was restored by the summer of 1943	Примечание Note
5	Витамины Vitamins	3	2	Выпуск никотиновой кислоты увеличен в 6 раз. Увеличивается выпуск аскорбиновой кислоты. Начали выпускать витамин С из хвои. Витаминоль не выпускается Nicotinic acid production has increased sixfold. Ascorbic acid production is also increasing. We have begun producing vitamin C from pine needles. Vitaminol is no longer produced
6	Дезинфицирующие препараты Disinfectants	6	3	Калий марганцовокислый производили раньше, производим и сейчас, но для медицинских целей меньше; в основном он идет как технический препарат для производства сахарина Potassium permanganate was produced in the past and is still produced today, but for medical purposes to a lesser extent; it is primarily used as a technical product for the production of saccharin
7	Диагностические препараты Diagnostic drugs	3	2	Сергозин, барий сернокислый для рентгенографии, лопоидол. Из них мы выпускаем сергозин и барий сернокислый Sergozin, barium sulfate for radiography, and lopoidol. We produce sergozin and barium sulfate
8	Диетическое питание Diet food	2	0	Группа препаратов диетического питания не вырабатывается The group of dietary food preparations is not produced
9	Жаропонижающие препараты Antipyretic drugs	6	4	Салипирин не выпускается сейчас. Пирамидон выпускается в 5 раз меньше, чем в 1940 году. Фенацетин будет выпущен, но в 8 раз меньше, чем в 1940 году. Антипирин снят с производства. Вместо него будет выпускаться пирамидон. Аспирин – в 2 раза меньше Salipirin is no longer produced. Pyramidon is produced at a fifth of its 1940 level. Phenacetin will be produced, but at an eighth of its 1940 level. Antipyrine has been discontinued. Pyramidon will be produced in its place. Aspirin is being produced at half its 1940 level
10	Желудочно-кишечные препараты Gastrointestinal drugs	8	5	Магнезии жженой и магнезии углекислой мы не производим. Производство висмута увеличено в 6 раз, танальбина – в 4 раза, бензонафтола – в 5 раз. Пепсина мы не вырабатываем. Салол выпускаем в значительно меньших количествах. Гидроксала выпустили в 1943 году 10 тонн We do not produce magnesia oxide or magnesia carbonate. Bismuth production has increased sixfold, tannalbin fourfold, and benzonaphthol fivefold. We do not produce pepsin. Salol is produced in significantly smaller quantities. Hydroxal production in 1943 was 10 tons
11	Кровезаменители Blood substitutes	2	4*	Трангсфузин, который раньше не вырабатывался, жидкость Сельцовского Trangsfusin, which was not produced before, Seltsovsky's liquid
12	Кровоостанавливающие препараты Hemostatic drugs	8	7	–
13	Мочегонные препараты Diuretics	4	1	–

Продолжение таблицы 1

№	Фармакологическая группа Pharmacological group	Производство до 1940 года Production before 1940	Восстановлено производство к лету 1943 года Production was restored by the summer of 1943	Примечание Note
14	Отхаркивающие препараты Expectorants	4	2	Аммоний хлористый и апоморфин восстановлены. Кодеин чистый и кодеин фосфорнокислый вырабатываются Ammonium chloride and apomorphine are recovered. Pure codeine and codeine phosphate are produced
15	Препараты для глазной практики Preparations for ophthalmic practice	4	2	Ртуть оксицианистая восстановлена. Атропин сернокислый – работаем. Цинк сернокислый вырабатывается в больших количествах, чем в 1940 году Mercury oxycyanate has been reduced. Atropine sulfate is in use. Zinc sulfate is being produced in greater quantities than in 1940
16	Препараты йода общего действия General-purpose iodine preparations	3	1	Йод кристаллический – его производство увеличено по сравнению с 1940 годом в полтора раза Crystalline iodine – its production has increased by one and a half times compared to 1940
17	Препараты обмена веществ Metabolism drugs	5	3	–
18	Противоглистные препараты Anthelmintic drugs	4	2	Цитварное семя вырабатывается в больших количествах Citvar seed is produced in large quantities
19	Противомалярийные препараты Antimalarial drugs	6	3	–
20	Противоревматические препараты Antirheumatic drugs	4	1	Антипирин, метиловый эфир салициловой кислоты – не выпускается сейчас, выпускается только салициловый натрий Antipyrine, methyl salicylate – no longer available; only sodium salicylate is available
21	Противосифилитические препараты Antisyphilitic drugs	4	1	В ассортименте 1940 года были 4 препарата: новарсенол, миасенол, биохинол и бисверрон. В ассортименте 1943 года остался только новарсенол In 1940, the product range included four drugs: novarsenol, miasenol, bioquinol, and bisverron. In 1943, only novarsenol remained in the range
22	Ранозаживляющие препараты Wound healing drugs	3	3	Йодоформ, парафиномасляная смесь, витедем, висмут субгалловый. Эти препараты вырабатываются в 2 раза меньших количествах, парафиномасляная смесь – новый препарат – вырабатывается в сотнях тонн. Витадерм снят с производства. Висмута субгаллового в этом году произведено в 2 раза меньше, чем до войны Iodoform, paraffin-oil mixture, Vitedem, and subgallic bismuth. These preparations are produced in half the quantities; paraffin-oil mixture, a new preparation, is produced in hundreds of tons. Vitaderm has been discontinued. Subgallic bismuth production this year is half that of pre-war levels

Продолжение таблицы 1

№	Фармакологическая группа Pharmacological group	Производство до 1940 года Production before 1940	Восстановлено производство к лету 1943 года Production was restored by the summer of 1943	Примечание Note
23	Сердечно-сосудистые препараты Cardiovascular drugs	9	5	Амилнитрит не восстановлен, кармин выпускается в значительно больших количествах, его производство по сравнению с 1940 годом увеличено. Диуретин остался в ассортименте. Производство кофеина бензоата увеличилось в 4 раза, адонилен остался. Новым препаратом является метилкофеин. В этом году мы выпустим первую тонну этого препарата Amyl nitrite has not been restored, carmine is produced in significantly larger quantities, its production having increased compared to 1940. Diuretin remains in the product range. Caffeine benzoate production has quadrupled, and adonylene remains. Methylcaffeine is a new drug. This year, we will produce the first ton of this drug
24	Слабительные препараты Laxatives	4	2	Фенолфталеин не восстановлен, Натрий виннокаменный в ассортименте остался, выпущено небольшое количество ртути однохлористой. Азофенин не выпускается Phenolphthalein has not been restored. Sodium tartaric acid remains in stock, and a small amount of mercury monochloride has been released. Azofenine is no longer produced
25	Сосудорасширяющие, сосудосжимающие и сосудовосстанавливающие препараты Vasodilators, vasoconstrictors and vasorestorative drugs	6	5	Септицин и эфедрин – как работали, так и работаем эти препараты. Сикален не восстановлен. Адреналин работаем. Кальций хлористый в порошке и растворе работаем в значительных количествах. Лобелин снят, и вместо него делаем сетицин, препарат, который здесь рассматривался лучшим, чем лобелин Septicin and ephedrine–these drugs continue to be used. Sicalen has not been restored. Adrenaline is being used. Calcium chloride, in powder and solution, is being used in significant quantities. Lobeline has been discontinued, and instead we are making seticin, a drug that was considered superior to lobeline
26	Стимулирующие препараты Stimulant drugs	5	6*	Мамин, оварин, пантокрин, спермин, тереоидин. Эти препараты вырабатывались до войны, вырабатываются и сейчас, но в значительно меньших количествах. Но зато производится новый препарат – фенамин Mamin, ovarin, pantocrine, spermine, and thyroidin. These drugs were produced before the war and are still produced today, but in significantly smaller quantities. However, a new drug, phenamine, is being produced
27	Тонизирующие препараты Tonics	8	0	Железо молочно-фосфорнокислое, железо лимоннокислое, железо с сахаром – все эти препараты мы не вырабатываем Iron lactate phosphate, iron citrate, iron with sugar – we do not produce all of these preparations

Окончание таблицы 1

№	Фармакологическая группа Pharmacological group	Производство до 1940 года Production before 1940	Восстановлено производство к лету 1943 года Production was restored by the summer of 1943	Примечание Note
28	Успокаивающие препараты Sedatives	4	0	Калий бромистый, камфора, натрий бромистый, бромурал – эта группа, к сожалению, не восстановлена Potassium bromide, camphor, sodium bromide, bromural – this group, unfortunately, has not been restored
29	Химиотерапевтические препараты Chemotherapeutic drugs	3	6*	Стрептоцид, сульфидин, сульфазол, альбуцид, сульгин, карборсан и АСГ. Из них не производится только карборсан Streptocide, sulfidine, sulfazole, albucid, sulgin, carborsan, and ASG. Of these, only carborsan is not produced

Примечание. * За счет внедрения новых препаратов.

Note. * Due to the introduction of new drugs.

Вторым моментом, который тормозит развитие производства, было отсутствие нужного оборудования. Особенно дефицитно эмалированное, вакуумно-компрессорное оборудование и центрифуги. На наших производствах сложилось такое положение, что отсутствие оборудования приводит не только к тому, что мы не имеем возможности расширять производство, но отсутствие резервного оборудования приводит к тому, что если происходит какая-нибудь авария с аппаратом, то останавливается все производство. Например, пирамидон вырабатывается на Алкалоидном заводе. Вышел из строя аппарат – и весь цех остановился.

Что мы намечаем на второе полугодие1943 года в производственном масштабе? Мы планируем восстановить производство еще пяти средств: новарсенола, адезала, плазмоцида, трипафлавина и меркузала. Значительно будет расширено производство аскорбиновой кислоты, глюкозы, акрихина, салициловых препаратов, а также будет выпущен в массовом количестве новый препарат «Норсульфазол».

В конце 1943 года мы начнем вводить и, очевидно, в I квартале 1944 года закончим введение в производство трех крупных цехов на востоке: новые цеха пирамидона, фенацетина и новокаина.

Кроме перечисленного, в 1944 году мы планируем восстановить производство лекарств на наших московских заводах, используя свободные площади, которые на сегодня имеются в значительных количествах. Ассортимент тех препаратов, которые в 1944 году мы будем восстанавливать, сейчас прорабатывается».

В заключение докладчик отметил, что заседание, которое сегодня проходит, будет для промышленников очень полезно: «Мы хотим услышать авторитетное мнение Фармакологического комитета, что именно нам нужно в первую очередь при разработке плана восстановления производства медикаментов и внесения в план новых, до сих пор не производившихся препаратов. Может быть, не все, что нам порекомендует ФК, мы сумеем выполнить, потому что мы лимитированы сырьем и оборудованием, но всякие пожелания в этом отношении промышленность может только приветствовать».

Далее председатель предложил слово представителю Главмедфармпрома и просил его сообщить хотя бы в общих чертах, как обстоят дела на их предприятиях.

Представитель Главмедфармпрома сообщил, что подведомственные им организации производят в основном галенику и лишь некоторые – химико-фармацевтические препараты. «Это производство ксероформа, производство протаргола и колларгола – серебряных препаратов и уротропина внутривенного, антисептика моносепта и консерванта крови цитрата натрия. Сформирована группа барбитуратов: веронал, люминал, гексенал. Все остальное будет, пожалуй, повторением того, что производится предприятиями Главхимфармпрома.

Что касается галеновых препаратов, нужно отметить, что ассортимент их сводится к сухим, жидким и густым экстрактам, растворам, таблеткам и ампулированной продукции. Ампулируем продукцию, полу-

ченную от Главхимфармпрома. Из наших новых препаратов можно назвать конвазид».

Представитель Главного аптечного управления (ГАПУ) дополнил общую картину по производству лекарственных средств, сообщив, что производственная деятельность аптекоуправления направлена на увеличение выработки простейшей галеники: «Наши производственные предприятия не приспособлены для сложной химической продукции, и если мы в этом отношении делали скромные попытки, то они были вызваны нашим патриотизмом и желанием помочь промышленности. В этой области мы в прошлом году сделали больше, чем в 1943 году, выработав, к примеру, антифебрина – полтонны, уротропина – 5 тонн, хлористого кальция кристаллического – 7 тонн, сернокислого бария – около 1,2 тонны, кальцекса – 4,5 тонны, адреналина – около 12 кг и так далее.

Что касается галеники, то ее мы выпускаем значительно больше, чем до войны, потому, что мы взяли курс на организацию новых лабораторий в тех местах, где их раньше не было. Например, в Кировской области и в республике Коми не было лабораторий, а сейчас они там имеются. В этом году будут открыты еще 20 лабораторий. Это имеет большое значение, так как наша продукция – многотоннажная и развозить ее по стране нет смысла. Поэтому мы поставили себе задачу – на местах, даже в скромных лабораториях, почти без оборудования готовить галенику. Сложных аппаратов у нас нет совершенно. Тем не менее в 15 пунктах мы сами сделали себе довольно сложную аппаратуру, потому что мы предполагаем значительно расширить выпуск галеники.

Лимитирует нас основное сырье, главным образом – спирт. Его мы от квартала в квартал получаем все меньше и меньше, а потребности в нем все увеличиваются. Здесь нам на помощь пришел ФК, который разрешил готовить настои на более слабом спирте.

Сейчас мы концентрируем внимание на выработке таблеток взамен жидких медикаментов. До конца года мы планируем выпустить около 204 тысяч таблеток, например, из адониса и из валерианы. Учитывая недостаток йода и недостаток спирта, мы поставили себе задачу выпустить не менее 1 млн штук таблеток из смеси кристаллического йода и йодистого калия».

В итоге, заслушав сообщения представителей промышленности, выпускающей лекарственные средства, председатель ФК и участвующие в совещании специалисты постановили: «Передать вопрос о номенклатуре необходимых к производству медикаментов на предварительное рассмотрение московского совещания фармакологов, с заслушиванием итогов работы этого совещания на одном из заседаний ФК».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленной стенограммы совещания ФК видно, в каком состоянии находилась ХФП в конце 1941 и на протяжении всего 1942 года. Потеря основных украинских заводов и срочная эвакуация ленинградских и московских фармацевтических предприятий практически полностью привела к прекращению производства лекарственных средств. Ситуацию ухудшило и полное отсутствие сырья для производства некоторых важных лекарственных веществ. Невозможно представить, какие трудности были преодолены инженерами эвакуированных фармацевтических заводов и фабрик в первой половине 1942 года для восстановления своего производства. Однако, достигнув практически «нулевой» точки, ХФП стала оживать, постепенно наращивая выпуск продукции. Так, к середине лета 1943 года ХФП заново освоила выпуск более половины всей номенклатуры лекарственных средств, выпускаемой до войны. Причем в производимом перечне средств появились новые позиции, производство которых было разрешено ФК лишь перед войной. Предприятия Главмедфармпрома к середине 1943 года также нарастили выпуск готовых лекарственных средств. Было освоено производство некоторых субстанций, из которых вырабатывались галеновые препараты. Из субстанций, произведенных на заводах смежников – Главхимфармпрома, в больших объемах готовились инъекционные средства. Особо следует отметить предприятия ГАПУ. Это небольшие, слабо оснащенные лаборатории, разбросанные по всей территории СССР. Несмотря на это, руководство ГАПУ приняло правильное решение по наращиванию количества подобных лабораторий. Благодаря этому довольно быстро было увеличено производство галеновых препаратов. Правильным решением специалистов ГАПУ была организация производства таблетированных форм из лекарственного растительного сырья.

Представленная информация в дальнейшем была заслушана и обсуждена специалистами, и на ее основе был сформирован список необходимых лекарственных препаратов, производство которых надо было наладить в первую очередь, а также разработан общий план работы ХФП на 1944–1945 годы. Несмотря на трудности, которые стояли перед предприятиями ХФП, руководство отрасли и сотрудники конкретных предприятий хорошо понимали, что ожидает от них руководство страны, армия и гражданское население. Время показало, что все шаги, которые проделала наша ХФП в начальные годы ВОВ, были правильными. Они позволили не только в кротчайшие сроки восстановить производство лекарственных средств, но и приступить к выпуску новых эффективных препаратов, с нетерпением ожидаемых на фронте.

Рекламная статья / Sponsored article

Возможности применения программного обеспечения Space CDS для работы на фармпредприятиях и переноса аналитических методик на ВЭЖХ LicArt 62

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке компании ООО «Лабконцепт»

Для любой аналитической лаборатории важны эффективность и универсальность программного обеспечения. Рост ассортимента оборудования требует интегрированных решений для управления различными приборами, упрощения обучения и ускорения адаптации методов. В статье рассматривается отечественное программное обеспечение Space CDS от ГК «Лабконцепт» – современное web-приложение для автоматизации работы аналитических приборов различных производителей и типов, таких как ВЭЖХ, ГХ, спектрофотометры и ИК-Фурье спектрометры. Программное обеспечение имеет ряд существенных преимуществ в управлении, обработке данных и формировании отчетов, что облегчает его использование и подтверждает важность для современных лабораторий, работающих по стандартам GMP и ISO 17025.

Application capabilities of the Space CDS software for pharmaceutical companies and method transfer with LicArt 62 HPLC

The authors prepared the article with the financial support of the company LLC" Labconcept"

For any analytical laboratory, software efficiency and versatility are essential. The growing variety of equipment necessitates integrated solutions for managing different instruments, simplifying training, and speeding up method implementation. This article discusses Space CDS, a domestic web-based software developed by Labconcept Group, designed to automate the operation of analytical instruments from various manufacturers and of different types, such as HPLC, GC, spectrophotometers, and FTIR spectrometers. The software offers several significant advantages in management, data processing, and report generation, which facilitate its use and underscore its importance for modern laboratories operating according to GMP and ISO 17025 standards.

В условиях глобальной цифровизации и автоматизации рабочих процессов постоянно повышаются требования не только к качеству оборудования, применяемого на различных стадиях производства, но и к программному обеспечению. Это в полной мере актуально и для фармацевтических предприятий, и, в частности, для их аналитических лабораторий.

Программное обеспечение должно не только давать пользователям возможность комфортно работать на аналитическом оборудовании и выполнять сбор и обработку данных, но и повышать общую эффективность лаборатории за счет автоматизации ведения, записи и хранения информации обо всех этапах анализа. Также несомненным преимуществом будет наличие единого интерфейса для управления различными типами приборов и достаточного функционала для обеспечения качественной и воспроизводимой обработки данных и переноса (трансфера) аналитических методик в случае диверсификации парка оборудования.

Для подобных «вызовов» наиболее подходящим и универсальным решением будет Space CDS – отечественное сетевое программное обеспечение от ГК «Лабконцепт», которое позволяет управлять приборами разных марок (LicArt 62, Shimadzu, Agilent) и типов (ВЭЖХ, ГХ, УФ-вид спектрофотометры, ИК-Фурье спектрометры). Данное ПО было специально разработано для предприятий, работающих по стандартам GMP и ГОСТ ИСО 17025. Для работы с программой пользователю достаточно иметь ПК с любым браузером, что делает работу со Space CDS максимально удобной. При этом доступ в интернет не требуется – достаточно локальной сети, объединяющей ядро сервера и клиентский ПК.

Space CDS доступно как в сетевой, так и в одиночной версии: можно объединять несколько единиц оборудования на базе единой программной платформы или работать с одним прибором на одном ПК. Все действия оператора и события фиксируются в

журнале аудита. Также есть возможность проверки и заверения данных на нескольких уровнях с помощью электронных подписей непосредственно в ПО. Результаты легко выводятся в отчеты с настройкой отображения через менеджер шаблонов.

Для удобного обучения и быстрого старта работы доступны предустановленные шаблоны отчетов. Необходимые параметры могут быть добавлены в отчет с помощью специальных тегов. Редактирование отчетов реализовано путем свободного редактирования файлов в текстовом формате: изменения можно вносить в привычных редакторах Word или OpenOffice. Это позволяет не только изменять содержимое и разметку страницы, но и настраивать общее оформление отчета (логотип, цвета, шрифт).

Одним из ключевых преимуществ Space CDS является унифицированный интерфейс для управления различными типами приборов от разных производителей. Это позволяет новым пользователям быстрее осваивать работу с системой, сокращает время выполнения задач и снижает вероятность ошибок, так как все инструменты и функции имеют одинаковую логику и расположение в ПО. Например, на рисунке 1 представлен виджет для контроля четырехканального насоса хроматографов LicArt 62, Agilent и Shimadzu.

Еще одна уникальная особенность Space CDS – возможность добавления пользовательских уравнений для обработки данных. При этом результаты анализа отображаются непосредственно внутри ПО. Кроме того, в системе можно настроить пользовательские поля, которые позволяют привязать к каждому испытуемому раствору такие параметры, как масса навески, разбавление, дозировка и другие необходимые данные. Этот функционал обеспечивает более полный контроль над процессами и значительно сокращает время обработки информации, исключая необходимость использования сторонних программ.

На сегодняшний день наиболее широкими возможностями оснащен драйвер ПО Space CDS для управления высокоэффективным жидкостным хроматографом LicArt 62. Это флагманский продукт ГК «Лабконцепт», который активно развивается и нашел широкое применение именно в лабораториях фармацевтических предприятий.

Поскольку многие пользователи уделяют особое внимание воспроизводимости методик на новом оборудовании, мы неоднократно сталкивались с задачами переноса и трансфера. За 3,5 года работы мы апробировали аналитические методики, направленные как на определение количественного содержания действующих веществ, так и на оценку содержания родственных примесей. Неоднократно приходилось как подбирать новые условия анализа, так и подтверждать возможность реализации имеющихся методик на LicArt 62. И здесь, благодаря широкому функционалу, ПО Space CDS отлично себя зарекомендовало.

Один из примеров – воспроизведение методики количественного определения бензалкония хлорида на двух хроматографах LicArt 62, оснащенных спектрофотометрическим детектором UV-62 и диодно-матричным детектором DAD-62, с использованием программных обеспечений LicArt WSV и Space CDS.

При использовании нового программного обеспечения одним из важных для комфортной работы критериев является формат отображения данных. На рисунках 2 и 3 представлено сравнение хроматограмм, полученных в разных ПО. На рисунке 3 дополнительно продемонстрирована функция условного форматирования, доступная только для Space CDS. Данная функция позволяет производить автоматическую маркировку данных на соответствие установленным нормам, что значительно облегчает интерпретацию результатов.

Пользователи часто сталкиваются с задачей определения родственных примесей методом ВЭЖХ. Чем больше пиков на хроматограмме, тем сложнее и длительнее становится процесс обработки данных. В Space CDS реализована возможность выбора одного

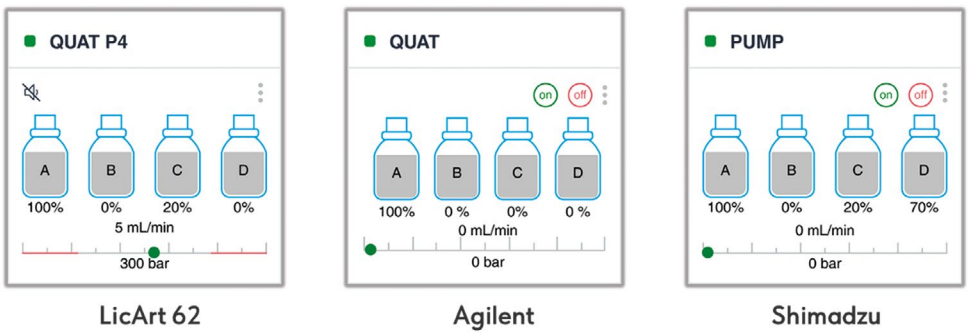


Рисунок 1. Виджет для отображения параметров четырехканального насоса хроматографов LicArt 62, Agilent и Shimadzu

Figure 1. Widget for displaying parameters of the four-channel pump of LicArt 62, Agilent, and Shimadzu

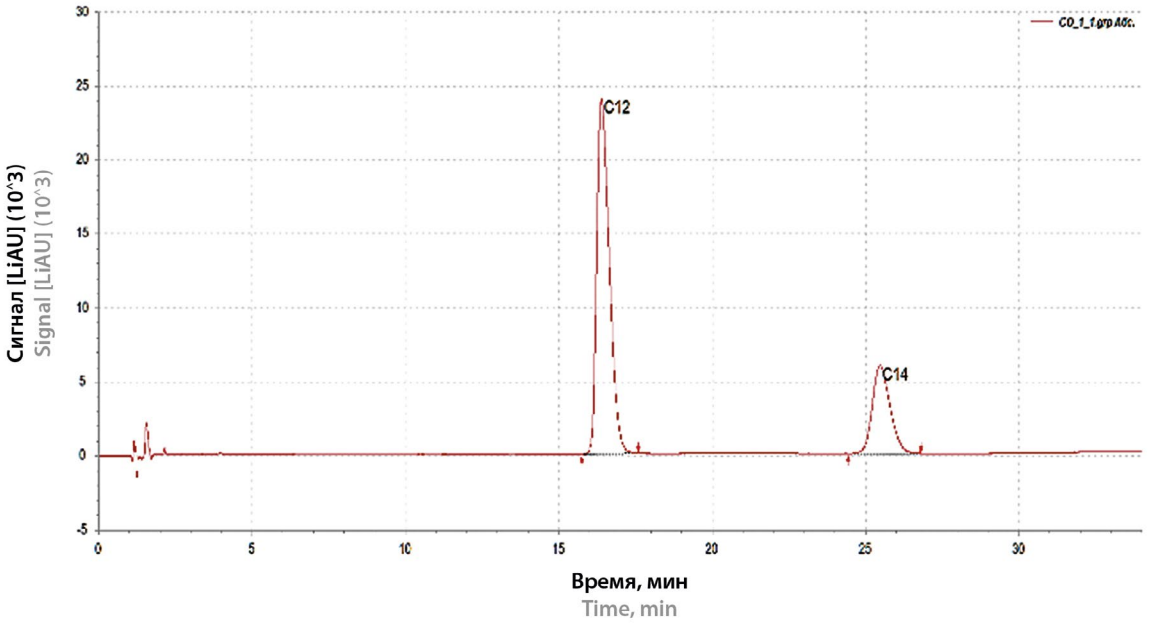


Рисунок 2. **Хроматограмма испытуемого раствора в программном обеспечении LicArt WSV**

Figure 2. **Chromatogram of the test solution in the LicArt WSV software**

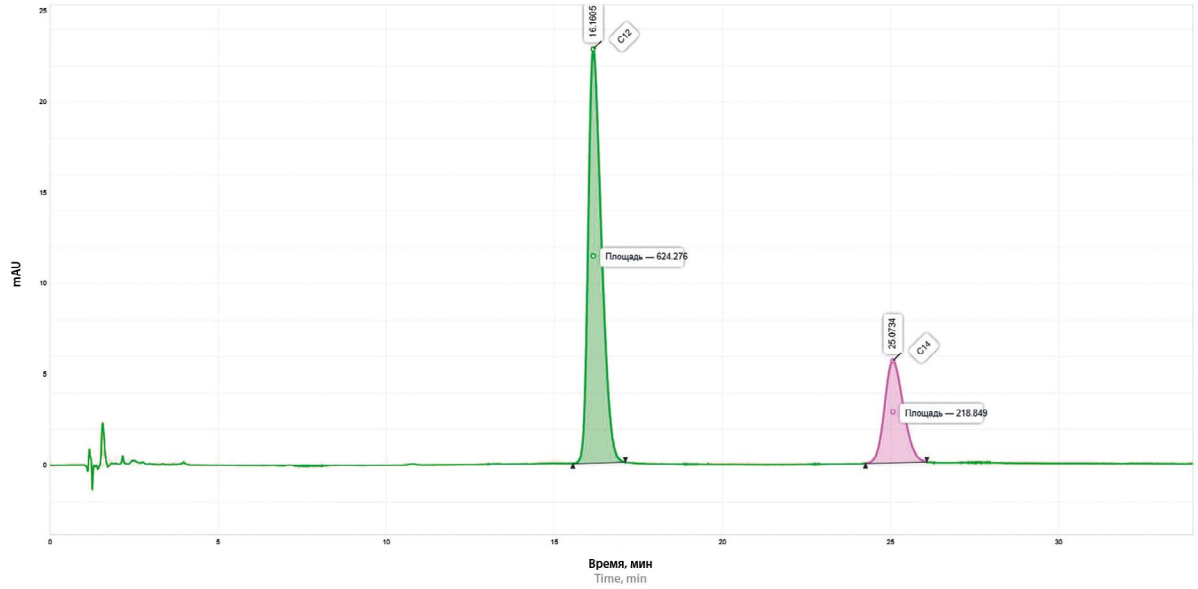


Рисунок 3. **Хроматограмма испытуемого раствора в программном обеспечении Space CDS**

Figure 3. **Chromatogram of the test solution in Space CDS software**

из двух интеграторов и режима интегрирования – ручной или автоматический. Параметры обработки можно настроить с высокой точностью, что позволяет обрабатывать даже сложные хроматограммы в автоматическом режиме.

Например, на рисунке 4 представлена хроматограмма раствора для идентификации примесей препарата, в составе которого действующими веществами являются азилсартан медоксомил калия и хлорталидон. В рамках трансфера этой методики нам удалось не только воспроизвести условия хроматографирования и получить воспроизводимые результаты, но и подобрать параметры интегрирования так, чтобы в автоматическом режиме точно разметить даже пики примесей низкой интенсивности.

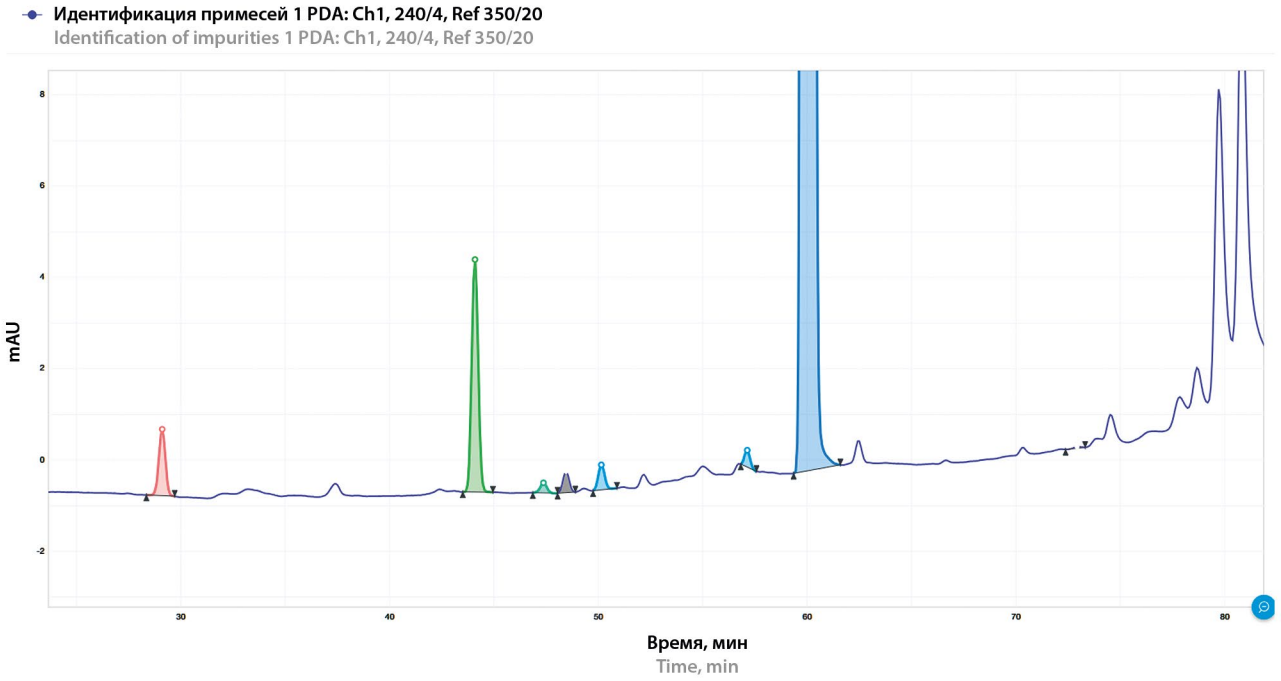


Рисунок 4. Азилсартан медоксомил калия + хлорталидон, хроматограмма раствора для идентификации родственных примесей

Figure 4. Azilsartan medoxomil potassium + chlorthalidone, chromatogram of the solution for identification of related impurities

Сотрудниками лаборатории ГК «Лабконцепт» только за последний год был успешно выполнен трансфер более 20 аналитических методик, что подтверждает, что хроматограф LicArt 62 является удобным и современным решением для многих аналитических лабораторий, а интеграция с продвинутым программным обеспечением Space CDS обеспечивает автоматизацию управления приборами, обработки данных и формирования отчетов в соответствии с международными стандартами.



gotoipheb.ru | +7 921 330 6218

IPhEB

Международная выставка и форум по фармацевтике и биотехнологиям

7–9 апреля 2026 | Санкт-Петербург

Поддержка:

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА

АССОЦИАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЕВРАЗИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА

СПХФУ с 1919 года на службе науки и здоровья нации

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

Организатор:

РЕСТЭК

Оригинальная статья / Research article

УДК 547.792.1; 547.796.1; 615.252.349.7

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2208

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка лекарственных средств на основе производных 5-фенилтетразола для фармакологической коррекции метаболитических нарушений

А. Ю. Гришина[1]✉, Д. В. Антоненко[2, 3], М. А. Скрыльникова[2, 3], О. В. Буюклинская[1], В. Ц. Болотова[1], В. Е. Кованскоv[1], В. А. Островский[2, 3]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (СПб ФИЦ РАН или ФГБУН СПб ФИЦ РАН). 199178, Россия, г. Санкт-Петербург, 14 линия, д. 39

[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» (СПбГТИ(ТУ)). 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 24–26/49, литера А

✉ **Контактное лицо:** Гришина Анна Юрьевна. **E-mail:** grishina.anna@pharminnotech.com

ORCID: А. Ю. Гришина – https://orcid.org/0000-0003-2448-513X;
Д. В. Антоненко – https://orcid.org/0009-0003-5152-818X;
М. А. Скрыльникова – https://orcid.org/0000-0001-5618-7917;
О. В. Буюклинская – https://orcid.org/0000-0002-4453-1079;
В. Ц. Болотова – https://orcid.org/0000-0001-7559-186X;
В. Е. Кованскоv – https://orcid.org/0000-0001-5783-8339;
В. А. Островский – https://orcid.org/0000-0002-6628-8540.

Статья поступила: 20.10.2025 **Статья принята в печать:** 22.12.2025 **Статья опубликована:** 26.12.2025

Резюме

Введение. Многие соединения, содержащие тетразольный фрагмент, превосходят по эффективности известные противодиабетические препараты в доклинических исследованиях, а некоторые кандидаты уже находятся на стадии клинических испытаний. Широкое применение тетразольных производных для воздействия на диабет-ассоциированные мишени и терапии сопутствующих осложнений подтверждает перспективность данного каркаса для разработки новых эффективных противодиабетических средств.

Цель. Исследование (*in silico*, синтез, *in vivo*) ряда гибридных производных 5-фенилтетразола с целью выявления и последующей экспериментальной проверки перспективных соединений, обладающих гипогликемической и противожировой активностью.

Материалы и методы. Синтез гибридных гетероциклических соединений осуществлен путем ацилирования хлорангидридом (5-фенилтетразол-2-ил)уксусной кислоты ряда гетероциклических производных *N*-алкил-5-аминотетразола, 4-амино-4*H*-1,2,4-триазол-3-тиола и 2-гидразинил-4,6-диметилпиримидина.

Результаты и обсуждение. В результате *in silico* (PASS, докинг, скоринг) исследования биологической активности в ряду производных 5-фенилтетразола распознаны наиболее перспективные «гибридные» (полиядерные) гетероциклические соединения: *N*'-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетогидразид, *N*-(3-меркапто-4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид, *N*-(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид, *N*-(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид и *N*-*трет*-бутил-2-({1-[2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил) ацетамидо]-1*H*-тетразол-5-ил}тио)ацетамид. Эти соединения, по данным компьютерного прогноза, представляют интерес как потенциальные средства для фармакологической коррекции различных метаболических нарушений. Разработан и реализован рациональный метод синтеза указанных соединений, строение и индивидуальность которых доказаны с применением современных инструментальных физико-химических методов. В ходе *in-vivo*-исследований показано, что данные гетероциклические соединения проявляют гипогликемическую и выраженную противожировую активность.

Заключение. Проведенное исследование гибридных производных 5-фенилтетразола выявило выраженную гипогликемическую активность. Обнаружено, что гиполипидемическая активность в данном случае не связана напрямую с гипогликемическим эффектом, в отличие от закономерности, характерной для сенситайзера метформина.

© Гришина А. Ю., Антоненко Д. В., Скрыльникова М. А., Буюклинская О. В., Болотова В. Ц., Кованскоv В. Е., Островский В. А., 2026
© Grishina A. Yu., Antonenko D. V., Skrylnikova M. A., Buyuklinskaya O. V., Bolotova V. Ts., Kovanskov V. E., Ostrovskii V. A., 2026

Ключевые слова: тетразол, хлорангидрид (5-фенилтетразол-2-ил)уксусной кислоты, ацилирование, молекулярный докинг, сахарный диабет II типа, ожирение

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

Вклад авторов. Д. В. Антоненко и М. А. Скрыльникова осуществили синтез соединений и доказали их строение. В. Е. Кованcков, О. В. Буюклинская провели исследования биологической активности соединений. В. Ц. Болотова – статистическая обработка данных. А. Ю. Гришина, Д. В. Антоненко, М. А. Скрыльникова, В. А. Островский – подготовка и редактура рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-13-00224, https://rscf.ru/project/23-13-00224/, с использованием оборудования инжинирингового центра Санкт-Петербургского государственного технологического института.

Для цитирования: Гришина А. Ю., Антоненко Д. В., Скрыльникова М. А., Буюклинская О. В., Болотова В. Ц., Кованcков В. Е., Островский В. А. Разработка лекарственных средств на основе производных 5-фенилтетразола для фармакологической коррекции метаболитических нарушений. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):30–42. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2208

Development of medicines based on 5-phenyltetrazole derivatives for the pharmacological correction of metabolic phenomena

Anna Yu. Grishina[1]✉, Dmitrii V. Antonenko[2, 3], Mariya A. Skrylnikova[2, 3], Olga V. Buyuklinskaya[1], Vera Ts. Bolotova[1], Vladislav E. Kovanskov[1], Vladimir A. Ostrovskii[2, 3]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences (SPC RAS). 39, 14th Line, Saint-Petersburg, 199178, Russia
[3] Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University) (SPbSTI(TU)). Bldg. A, 24–26/49, Moskovsky prospekt, Saint-Petersburg, 190013, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna Yu. Grishina. **E-mail:** grishina.anna@pharminnotech.com

ORCID: Anna Yu. Grishina – https://orcid.org/0000-0003-2448-513X;
Dmitrii V. Antonenko – https://orcid.org/0009-0003-5152-818X;
Mariya A. Skrylnikova – https://orcid.org/0000-0001-5618-7917;
Olga V. Buyuklinskaya – https://orcid.org/0000-0002-4453-1079;
Vera Ts. Bolotova – https://orcid.org/0000-0001-7559-186X;
Vladislav E. Kovanskov – https://orcid.org/0000-0001-5783-8339;
Vladimir A. Ostrovskii – https://orcid.org/0000-0002-6628-8540.

Received: 20.10.2025 **Accepted:** 22.12.2025 **Published:** 26.12.2025

Abstract

Introduction. Many compounds containing a tetrazole component are superior in efficacy to other antidiabetic drugs in preclinical studies, and some candidates are already in current trials. The widespread use of tetrazole derivatives to target diabetes-associated targets and therapies that maintain their stability provide the basis for the development of new, effective antidiabetic agents.

Aim. A study (*in silico*, synthesis, *in vivo*) of a series of hybrid 5-phenyltetrazole derivatives was conducted to identify and conduct experimental validation of promising compounds exhibiting hypoglycemic and anti-fat activity.

Materials and methods. The synthesis of hybrid heterocyclic compounds was accomplished by acylation of a series of heterocyclic derivatives of *N*-alkyl-5-aminotetrazole, 4-amino-4*H*-1,2,4-triazole-3-thiol, and 2-hydrazinyl-4,6-dimethylpyrimidine with 5-phenyltetrazol-2-ylacetic acid chloride.

Results and discussion. As a result of *in silico* (PASS, docking, scoring) study of biological activity in a series of 5-phenyltetrazole derivatives, the most promising "hybrid" (polynuclear) heterocyclic compounds were identified: *N*'-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetohydrazide, *N*-(3-mercapto-4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide, *N*-(1-methyl-1*H*-tetrazol-5-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide, *N*-(2-methyl-2*H*-tetrazol-5-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide and *N*-tert-butyl-2-({1-[2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)acetamido]-1*H*-tetrazol-5-yl}thio)acetamide. These predictions are of interest as potential computer-aided means for the pharmacological correction of various metabolic phenomena. A rational method for synthesizing these compounds was developed and implemented, the structure and individuality of which were demonstrated using modern instrumental physicochemical methods. *In vivo* studies demonstrated that these heterocyclic compounds exhibit hypoglycemic and pronounced anti-lipid activity.

Conclusion. The study of hybrid 5-phenyltetrazole derivatives revealed pronounced hypoglycemic activity. It was found that the anti-lipid activity in this case is not directly related to the hypoglycemic effect, unlike the manifestation characteristic of the sensitizer metformin.

Keywords: tetrazole, acid chloride, 5-phenyltetrazol-2-yl acetic acid, acylation, molecular docking, type II diabetes mellitus, obesity

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. Dmitrii V. Antonenko and Mariya A. Skrylnikova successfully synthesized the compounds and proved their structures. Vladislav E. Kovanskov and Olga V. Buyuklinskaya conducted the biological activity study of the method. Vera Ts. Bolotova performed statistical data processing. Anna Yu. Grishina, Dmitrii V. Antonenko, Mariya A. Skrylnikova, and Vladimir A. Ostrovskii prepared and edited the manuscripts.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-13-00224, https://rscf.ru/project/23-13-00224/, using equipment from the engineering center of the St. Petersburg State Technological Institute.

For citation: Grishina A. Yu., Antonenko D. V., Skrylnikova M. A., Buyuklinskaya O. V., Bolotova V. Ts., Kovanskov V. E., Ostrovskii V. A. Development of medicines based on 5-phenyltetrazole derivatives for the pharmacological correction of metabolic phenomena. *Drug development & registration*. 2026;15(1):30–42. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2208

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой российской фармацевтической индустрии является разработка оригинальных импортозамещающих лекарственных средств мультитаргетного действия для фармакологической коррекции метаболических нарушений [1]. Важной проблемой отечественного здравоохранения в этом контексте является разработка лекарственных средств против сахарного диабета 2-го типа. В настоящее время число случаев сахарного диабета 2-го типа в мире постоянно растет, и это заболевание рассматривается Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как одна из эпидемий неинфекционных хронических заболеваний, охватывающих различные группы населения, независимо от страны проживания, пола, возраста, этнической принадлежности. По официальной статистике, в мире зарегистрированы сотни миллионов случаев сахарного диабета 2-го типа. В соответствии с прогнозом, представленным Международной диабетической федерацией (IDF), общее число людей, страдающих этим заболеванием, может увеличиться до 643 миллионов к 2030 году и до 783 миллионов к 2045 году [2, 3]. Известно, что пациенты, страдающие сахарным диабетом 2-го типа, находятся в зоне риска развития осложнений. В связи с этим лекарственная терапия данного заболевания должна быть направлена на коррекцию биологических механизмов, ответственных за различные патогенные метаболические процессы. Например, в исследованиях последних лет надежно установлена связь между диабетом 2-го типа и ожирением [2, 4]. В связи с этим актуальной проблемой является разработка мультитаргетных лекарственных средств для фармакологической коррекции метаболитических нарушений, возникающих на фоне диабета 2-го типа. В этом контексте весьма перспективными являются производные высокоазотистого гетероцикла – тетразола, среди которых найдены высокоэффективные лекарственные средства для лечения заболеваний различной этимологии, в том числе блокбастеры современного фармацевтического рынка [5]. Тетразольный цикл, по мнению ведущих экспертов, является уникальным и универсальным фармакофорным фрагментом, предназначенным для конструирования лекарственных средств, обладающих мультитаргентным действием. Эта уникальность обусловлена рядом факторов. Важнейшим является способность тетразольного фрагмента проявлять свойства биоизостерических аналогов *cis*-амидной и карбоксильной групп [5], а также образовывать многоцентровые водородные связи [6]. В последнее время отмечается интенсивный рост числа публикаций, посвященных поиску в ряду производных тетразола эффективных лекарственных средств для лечения диабета 2-го типа [7]. Ранее нами были синтезированы и рекомендованы к исследованию антигликирующей активности соединения **2b–6b** (рисунок 1), для которых, по данным компьютерного (*in silico*) прогноза, следовало ожидать проявления выраженной антигликирующей активности [8]. К сожалению, низкие выходы соединений **2b–6b** не позволили получить вещества в достаточном количестве для проведения системных и комплексных исследований противодиабетической, а возможно, и сопутствующих видов активности. Мы сочли интересным и важным вернуться к исследованию соединений **2b–6b** на новом уровне, для чего усовершенствовали методики синтеза, приведенные в эксперимен-

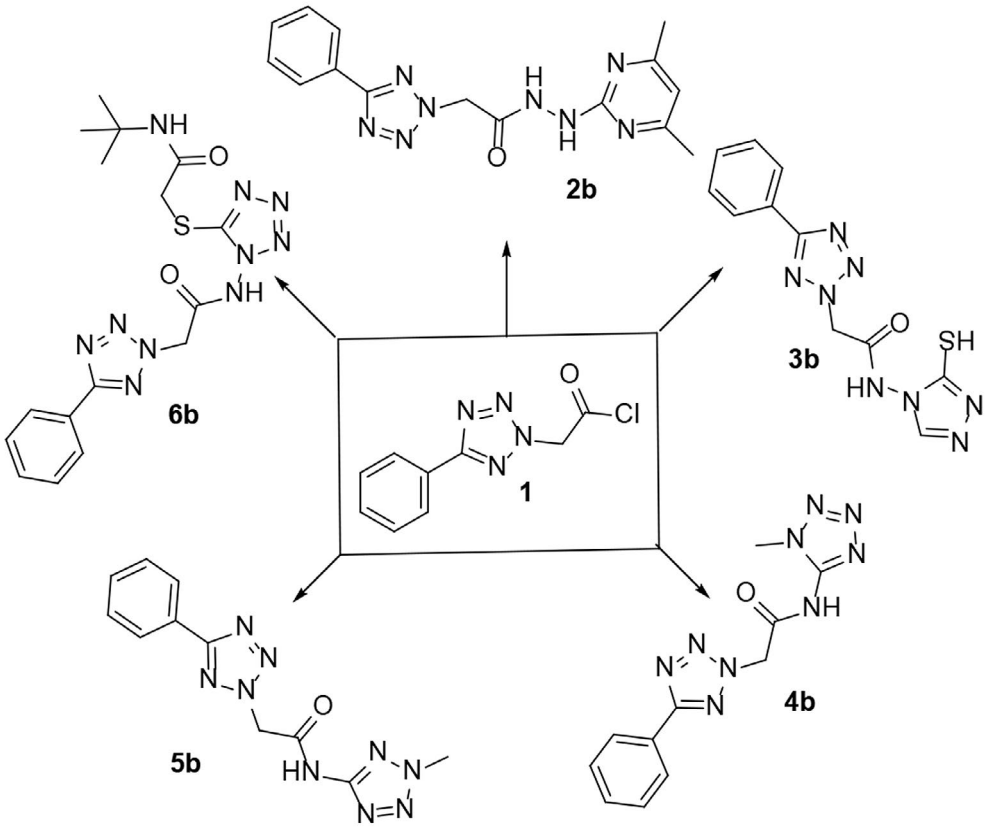


Рисунок 1. Производные 2b–6b хлорангидрида (5-фенил-тетразол-2-ил)уксусной кислоты 1

Figure 1. Derivatives of the 2b–6b acid chloride of 5-phenyl-tetrazol-2-yl acetic acid 1

тальной части настоящей статьи. Следуя этим методикам, мы наработали соединения **2b–6b** в достаточном количестве (не менее 3 г каждое), что оказалось достаточным для проведения на новом уровне исследований *in-silico*- и *in-vivo*-активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры записаны на приборе Shimadzu 8400-FTIR (Shimadzu Corporation, Япония) в таблетках KBr. Спектры ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР зарегистрированы на спектрометре Bruker Avance III (Bruker Corporation, США) на частотах 400,17 Гц (^{1}H), 101,62 Гц (^{13}C) в DMSO-d_6 при 25 °C, в качестве внутреннего стандарта использовались остаточные сигналы растворителя DMSO-d_6 (H – 2,50 м.д., C – 39,51 м.д.). Масс-спектроскопические данные были получены на приборе Agilent 6530 Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, США). Температуры плавления определены на приборе Büchi M-560 (BUCHI Labortechnik AG, Швейцария) со скоростью нагрева 1 °C/мин в интервале плавления. Контроль за индивидуальностью полученных соединений осуществлен методом ТСХ на пластинах Silica gel 60 F254, проявление в УФ-свете (254 нм). Колоночную хроматографию проводили на сорбенте Silica 60 (0,063–0,200 мм), в качестве элюента использовали смесь растворителей $CHCl_3$–MeOH.

Использование колоночной хроматографии для очистки соединений на последней стадии синтеза позволило повысить выходы в среднем на 7 %.

Хлорангидрид (5-фенилтетразол-2-ил)уксусной кислоты (**1**), 2-гидразинил-4,6-диметилпиримидин (**2a**), 4-амино-4*H*-1,2,4-триазол-3-тиол (**3a**), 2-метил-1*H*-тетразол-5-амин (**4a**), 1-метил-2*H*-тетразол-5-амин (**5a**), 2-[(1-амино-1*H*-тетразол-5-ил)тио]-*N*-*трет*-бутилацетамид (6a) получали и очищали как описано в работах [7–8]. Свойства соединений соответствуют литературным данным.

Синтез соединений 2b–6b (общая методика). К раствору 1,0 г (4,5 ммоль) хлорангидрида 1 в 30 мл ацетонитрила (ч.д.а., АО «ЭКОС-1», Россия) при перемешивании добавляли 4 ммоль амина. Реакционную массу охлаждали до 0–5 °C и добавляли по каплям (4,5 ммоль) триэтиламина (х.ч., АО «ВЕКТОН», Россия), затем кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ ($CHCl_3$–MeOH). После охлаждения смеси до комнатной температуры растворитель отгоняли при пониженном давлении на роторном испарителе. Очищали при помощи колоночной хроматографии в системе $CHCl_3$–MeOH 97 : 3 → 9 : 1.

***N'*-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетогидразид (2b).** Выход 1,1 г (85 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 228 °C, R_f 0,56 ($CHCl_3$–MeOH (9:1, об.)). Спектр ^{1}H-ЯМР (δ, м.д.): 2,26** (6H, с, $2CH_3$); 2,33* (6H, с, $2CH_3$); 5,61* (2H, с, CH_2); 5,62** (2H, с, CH_2); 6,57** (1H, с, H пиримидин); 6,71* (1H, с, H пиримидин); 7,57–7,60 (3H, м, H Ph); 8,06–8,09 (2H, м, H Ph); 8,90** (1H, с, $NHC_4N_2H_4$); 9,09* (1H, с, $NHC_4N_2H_4$); 9,79* (1H, с, NHC(O)); 10,40** (1H, с, NHC(O)). Спектр ^{13}C-ЯМР (δ, м.д.): 23,9** (CH_3); 24,0* (CH_3); 53,9* (CH_2); 54,1** (CH_2); 111,9** (C_5 пиримидин); 112,9* (C_5 пиримидин); 126,8 (C_{Ph}); 127,3 (C_{Ph}); 129,8 (C_{Ph}); 131,1 (C_{Ph}); 162,9 (C_2 пиримидин); 164,5** (C=O); 164,7 (CN_4); 167,6** ($C_{4,6}$ пиримидин); 168,1 ($C_{4,6}$ пиримидин); 169,2* (C=O). ИК-спектр, ν, $см^{-1}$: 3307 (N–H), 3033 (C–H), 1683 (C=O), 1450, 1041 (CN_4), 819, 788 (CN_4). Найдено: *m/z* – 325,1530 $[M + H]^+$, вычислено: 325,1520.

В экспериментальной части одной звездочкой (*) обозначены сигналы *Z*-изомера, двумя звездочками (**) обозначены сигналы *E*-изомера.

***N*-(3-меркапто-4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (3b).** Выход 1,1 г (85 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 272 °C (с разл.), R_f 0,32 ($CHCl_3$–MeOH (95:5, об.)). Спектр ^{1}H-ЯМР (δ, м.д.): 5,88 (2H, с, CH_2); 7,59–7,57 (3H, м, H Ph); 8,10–8,08 (2H, м, H Ph); 8,67 (1H, с, CH); 12,14 (1H, с, NH); 14,01 (1H, с, SH). Спектр ^{13}C-ЯМР (δ, м.д.): 53,78 (CH_2); 126,88 (C_{Ph}); 127,08 (C_{Ph}); 129,83 (C_{Ph}); 131,25 (C_{Ph}); 142,96 (C_5 триазол); 164,74 (C_3 триазол); 164,86 (CN_4); 166,89 (C=O). ИК-спектр, ν/$см^{-1}$: 3150 (NH), 1737 (C=O), 1280, 1180, 1072, 1044, 1026 (CN_4), 1326 (Me), 1610, 733, 665 (Ph), 553 (C–S). Найдено: *m/z* – 325,0591 $[M + Na]^+$, вычислено: 325,0593.

***N*-(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (4b).** Выход 0,79 г (70 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 204–207 °C, R_f 0,46 ($CHCl_3$–MeOH (95:5, об.)). Спектр ^{1}H-ЯМР (δ, м.д.): 3,92 (3H, с, CH_3); 6,00 (2H, с, CH_2); 7,59–7,53 (3H, м, H Ph); 8,10–8,06 (2H, м, H Ph); 11,84 (1H, с, NH). Спектр ^{13}C-ЯМР (δ, м.д.): 34,13 (CH_3); 54,81 (CH_2); 126,40 (C_{Ph}); 126,65 (C_{Ph}); 129,37 (C_{Ph}); 130,77(C_{Ph}); 149,25 (CN_4); 164,35 (CN_4); 164,77 (C=O). ИК-спектр, ν/$см^{-1}$: 3255 (N–H), 2989, 2924 (C–H), 1726 (C=O), 1573, 1450, 1288, 1110, 1073, 1026, 972 (CN_4). Найдено: *m/z* – 286,1158 $[M + H]^+$, вычислено: 286,1159.

***N*-(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (5b).** Выход 0,78 г (69 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 195–199 °C, R_f 0,65 ($CHCl_3$–MeOH (95:5, об.)). Спектр ^{1}H-ЯМР (δ, м.д.): 4,32 (3H, с, CH_3); 5,88 (2H, с, CH_2); 7,59–7,53 (3H, м, H Ph); 8,10–8,06 (2H, м, H_{Ph}); 11,79 (1H, с, NH). Спектр ^{13}C-ЯМР (δ, м.д.): 39,86 (CH_3); 54,99 (CH_2); 126,39 (C_{Ph}); 126,73 (C_{Ph}); 129,35 (C_{Ph}); 130,72 (C_{Ph}); 158,92 (CN_4); 162,93 (CN_4); 164,31 (C=O). ИК-спектр, ν/$см^{-1}$: 3255 (N–H), 2935 (C–H), 1693 (C=O), 1573, 1450, 1226, 1199, 1041, 972 (CN_4). Найдено: *m/z* – 286,1156 $[M + H]^+$, вычислено: 286,1159.

***N*-*трет*-бутил-2-({1-[2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)ацетамидо]-1*H*-тетразол-5-ил}тио)ацетамид (6b).** Выход 0,75 г (45 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 168–169 °C, R_f 0,82 ($CHCl_3$—MeOH (95:5, об.)). Спектр ^{1}H-ЯМР (δ, м.д.): 1,25 (9H, с, $C(CH_3)_3$); 4,12 (2H, с, CH_2); 6,08 (2H, с, CH_2); 7,59–7,56 (3H, м, H Ph); 7,98 (1H, с, NH); 8,10–8,08 (2H, м, H Ph); 13,21 (1H, с, NH). Спектр ^{13}C-ЯМР (δ, м.д.): 28,76 ($C(\underline{C}H_3)_3$); 37,60 ($\underline{C}(CH_3)_3$); 51,19 (CH_2); 53,80 (CH_2); 126,92 (C_{Ph}); 127,03 (C_{Ph}); 129,80 (C_{Ph}); 131,25 (C_{Ph}); 156,01 (C–HS); 164,84 (CN_4); 164,97 (C=O); 165,34 (C=O). ИК-спектр, ν/$см^{-1}$: 3401, 3117 (N–H), 2972, 2875 (C–H), 1649 (C=O), 1549, 1452, 1278, 1194, 1027, 965 (CN_4). Найдено: *m/z* – 417,1582 $[M + H]^+$, вычислено: 417,1570.

In-silico-эксперимент

На первом этапе исследования *in silico* оценили вероятность проявления различных видов активности при помощи программы PASS Online 2022[1]. Для оценки докинг-взаимодействий применяли сервис 1-click-docking[2].

In-vivo-эксперимент

Все животные были получены из ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.), содержались в условиях 12/12-часового свето-темнового режима, получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Все процедуры с животными в исследовании были одобрены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протоколы заседания № Rats-A/Д-01/Диаб-23, № Mice-A/Д-01/Диаб-23 от 15.09.2023). Манипуляции с животными проводились согласно документам системы менеджмента качества ЦЭФ ФГБОУ ВО СПХФУ, каждый из этапов исследования регламентировала установленная СОП. К работе с животными допускались сотрудники, имеющие соответствующую квалификацию и прошедшие обучение. Настоящее исследование было проведено в соответствии со стандартами, международно признанными в настоящий момент. Исследование проведено на базе Центра экспериментальной фармакологии СПХФУ с целью определения гипогликемической активности и смежных эффектов азот-, серо- и кислородсодержащих гетероциклических соединений.

[1] Way2drug. Available at: https://www.way2drug.com/all/ Accessed: 20.10.2025.

[2] 1-click-docking. Available at: https://mcule.com/apps/1-click-docking/ Accessed: 20.10.2025.

Эксперимент по изучению гипогликемической активности субстанции **2b** выполняли на 15 белых крысах-самцах с массой тела от 170 до 200 г. Приготовление доз для введения (100 мг/кг для соединения **2b** и 300 мг/кг по метформину) осуществлялось в день введения. В качестве референтного препарата использовали оригинальный препарат метформина – Сиофор® 500, серия 0821021. Доза для введения испытуемого вещества готовилась путем его растирания до состояния тонкодисперсного порошка в фарфоровой ступке и последующего суспендирования навески полученной массы в растворителе (вода очищенная) с добавлением стабилизатора (твин-80) и получением тонкодисперсных водных суспензий. Введение происходило однократно через зонд. Животным контрольной группы вводили воду очищенную. Через 30 мин однократно вводили раствор гидрохлорида адреналина (1 мг · мл$^{-1}$) в дозе 1 мг · кг$^{-1}$ подкожно. Определяли исходный уровень глюкозы в крови через 1, 2, 3 ч после введения адреналина. Измерения проводили с помощью глюкометра «Аккю-Чек Актив» (Roche Diagnostics, Швейцария) и тест-полосок. Для этого животному надрезали десну между нижними резцами и полученную кровь наносили на тест-полоску. Результаты фиксировали и рассчитывали среднее значение на каждом временном отрезке.

Изучение гипогликемической активности соединений **3b** и **2b** проводилось на 32 черных мышах линии C57Bl/Ks-db+/+m (*db/db*) массой 45–50 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область, РФ). Данную тест-систему можно охарактеризовать следующим образом: окрас шерсти черный; инбридинг Fn+8, генотип a, db+/+m, животные несут рецессивный ген диабета db (8-я группа сцепления, 4-я хромосома), ген db в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сопровождается аномальным ожирением. Гликемия очень высокая, уровень утилизации глюкозы снижен, дефицита инсулина нет, самцы и самки бесплодны, рецессивный ген m-misty, осветляющий окраску маркер оппозитной хромосомы, не несущий гена db [9]. Животные содержались в период адаптации и эксперимента по восемь особей. Непосредственно перед началом эксперимента животные были рандомизированы на 4 группы: 1) контроль (n = 8; 0,9 % физиологический раствор); 2) референт (n = 8; 300 мг/кг); 3) **3b** (n = 8; 0,5 мл/животное); 4) **2b** (n = 8; 100 мг/кг).

Испытуемые образцы вводились внутрижелудочно с помощью зонда 1 раз в сутки в течение 8 недель. Животные контрольной группы получали воду очищенную в эквиобъемных количествах. Использовали также препарат сравнения метформин (Сиофор®) в дозе 300 мг · кг$^{-1}$, его вводили в виде суспензии. Кровь забирали из ретроорбитального синуса, после чего измеряли уровень глюкозы с помощью биохимического анализатора ERBA XL. Дополнительно проводили биоимпедансный анализ по окончании периода лечения с помощью спектроскопического импедансометра ImpediVET® BIS1 (ImpediMed, Inc., США) после предварительной наркотизации золазепамом/тилетамином (Золетил®, Virbac, Франция; 25 мг · кг$^{-1}$ внутримышечно) с ксилазином (Ксила®, Interchemie, Нидерланды; 10 мг · кг$^{-1}$ внутримышечно). Определяли массу жира (%), выполняя для каждого животного три последовательных измерения с интервалом 3 с при заданных параметрах: пропорция тела 1,0, плотность тела 1,05 г · см$^{-3}$, константа гидратации 0,732, коэффициенты сопротивления ρi = 1220.2 и ρe = 998.9.29.

Исследование фармакологических эффектов субстанций **4b** и **5b** проведено на 20 черных мышах линии C57BL/Ks-db+/+m при многократном 14-дневном внутрижелудочном введении в виде водной суспензии с предварительным растворением в ДМСО. Испытуемые образцы вводили внутрижелудочно в течение 14 дней ежедневно в объеме 0,5 мл/животное в дозировке 100 мг/кг. Животные контрольной группы получали воду очищенную в эквиобъемных количествах. Также использовали препарат сравнения метформин (Сиофор®) в дозе 300 мг/кг, который вводили в виде суспензии. В ходе работы регистрировали массу тела, проводили биоимпедансометрию. В конце эксперимента забирали кровь из ретроорбитального сплетения, помещали в центрифужную пробирку объемом 2 мл без антикоагулянта и оставляли при комнатной температуре на 30 мин для свертывания и расслоения. Затем образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант отделяли от сгустка и немедленно замораживали, хранили при температуре –40 °C до проведения анализа.

Уровень глюкозы и гликированного гемоглобина оценивали при помощи биохимического анализатора «Эрба Лахема» (Чехия). Животных выводили из эксперимента спустя 15 дней после начала введения. Эвтаназию животных проводили в соответствии с внутренним стандартизированным операционным протоколом путем усыпления углекислым газом в CO_2-боксе модели THF3481-V01 (BIOSCAPE (EHRET), Германия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения количественных признаков при малом числе наблюдений проводили с использованием W-критерия Шапиро – Уилка, при достаточном числе наблюдений – с помощью теста Д'Агостино – Пирсона. При нормальном распределении данных значимость различий в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Для оценки различий между выборками при повторных измерениях с нормальным распределением применяли двусторонний дисперсионный анализ повторных измерений с поправкой Гейссера – Гринхауса с последующим тестом множественного сравнения Тьюки HSD. Для сравнения выживаемости выборок исполь-

зовали тест Логранка. Количественные данные представили в виде средних значений и стандартных отклонений (M ± SD). Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез соединений 2b–6b

Соединения **2b–6b** получали путем последовательных превращений, начиная с 5-фенилтетразола. Ключевым интермедиатом в данной схеме синтеза целевых соединений является хлорангидрид **1** (рисунок 2).

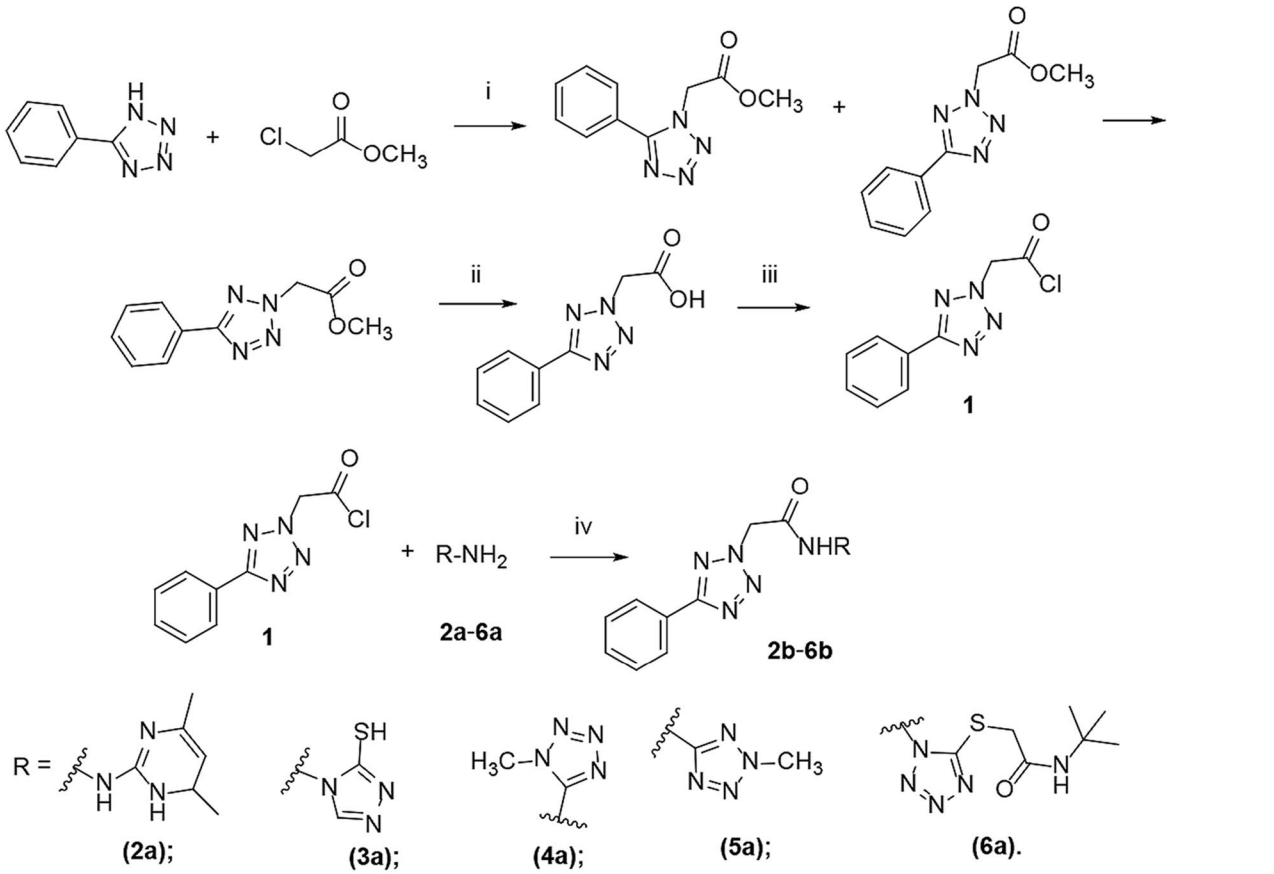
In-silico-прогноз биологической активности

В настоящей работе мы выполнили расширенные *in-silico*-исследования соединений **2b–6b**, включающие анализ спектра биологической активности с помощью программы PASS-2022, а также молекулярный докинг (скоринг) [10–12].

Программа PASS-2022 прогнозирует вероятности наличия (Pa) и отсутствия (Pi) различных видов биологической активности. Существует прямая зависимость между величинами Pa/Pi и шансом обнаружения эффекта: он возрастает с увеличением Pa и уменьшением Pi. Статистическая устойчивость этих зависимостей, а следовательно, и надежность прогноза обеспечивается алгоритмами PASS-online, которые выявляют строгие закономерности «структура – активность».

Поскольку прогнозируемый спектр действия исследуемых соединений весьма обширен, в настоящем исследовании рассматриваются лишь те виды активности, для которых вероятность Pa превышает установленный порог в 0,4 (таблица 1).

Согласно прогнозу, все исследуемые соединения с высокой вероятностью могут проявлять такие виды биологической активности, как противовирусная, противодиабетическая, гиполипидемическая, а также активность в лечении атеросклероза.



i: MeCN, Et_3N. 50 °C, 4h, 65 %; ii: NaOH, MeOH, 50 °C, 1h, 74 %; iii: PCl_5, 90 °C, 1h, 96 %; iv: MeCN, Et_3N, reflux, 4h, 45-85 %.

Рисунок 2. Синтез «гибридных» тетразолсодержащих гетероциклических соединений 2b–6b из 5-фенилтетразола через ключевой интермедиат – хлорангидрид (5-фенилтетразол-2ил)уксусной кислоты 1

Figure 2. Synthesis of "hybrid" tetrazole-containing heterocyclic compounds 2b–6b from 5-phenyltetrazole via the key intermediate – the acid chloride of 5-(phenyltetrazol-2-yl) acetic acid 1

Таблица 1. Результаты *in silico* (PASS-2022) прогнозирования биологической активности производных 5-фенилтетразола 2b–6b

Table 1. Results of *in silico* (PASS-2022) prediction of the biological activity of 5-phenyltetrazole derivatives 2b–6b

Pa	Pi	Активность Activity
***N'*-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетогидразид (2b)** ***N'*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetohydrazide (2b)**		
0.859	0.011	Ингибитор альфа-глюкозидазы Alpha-glucosidase inhibitor
0.831	0.011	Ингибитор фактора транскрипции Transcription factor inhibitor
0.634	0.048	Ингибитор бета-лактамазы Beta lactamase inhibitor
0.552	0.072	Ингибитор ДНК-полимеразы бета DNA polymerase beta inhibitor
0.548	0.022	Ингибитор стрептокиназы А Streptokinase A inhibitor
***N*-(3-меркапто-4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (3b)** ***N*-(3-mercapto-4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide (3b)**		
0.940	0.004	Ингибитор фактора транскрипции Transcription factor inhibitor
0.857	0.015	Ингибитор бета-лактамазы Beta lactamase inhibitor
0.757	0.024	Ингибитор альфа-глюкозидазы Alpha-glucosidase inhibitor
0.658	0.046	Ингибитор ДНК-полимеразы бета DNA polymerase beta inhibitor
0.618	0.051	Ингибитор ДНК-направленной ДНК-полимеразы DNA directed DNA polymerase inhibitor
***N*-(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (4b)** ***N*-(1-methyl-1*H*-tetrazol-5-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide (4b)**		
0.744	0.031	Ингибитор бета-лактамазы Beta lactamase inhibitor
0.666	0.015	Неопиоидный анальгетик Analgesic, non-opioid
0.646	0.038	Ингибитор фактора транскрипции Transcription factor inhibitor
0.569	0.029	Ингибитор MAP-киназы 1 MAP kinase 1 inhibitor
0.456	0.094	Ингибитор альфа-глюкозидазы Alpha-glucosidase inhibitor
***N*-(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (5b)** ***N*-(2-methyl-2*H*-tetrazol-5-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide (5b)**		
0.901	0.004	Лечение атеросклероза Atherosclerosis treatment
0.657	0.036	Ингибитор фактора транскрипции Transcription factor inhibitor
0.643	0.005	Гиполипидемическое средство Hypolipidemic
0.621	0.050	Ингибитор бета-лактамазы Beta lactamase inhibitor
0.425	0.104	Ингибитор альфа-глюкозидазы Alpha-glucosidase inhibitor
***N-трет*-бутил-2-({1-[2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)ацетамидо]-1*H*-тетразол-5-ил}тио)ацетамид (6b)** ***N-tert*-butyl-2-({1-[2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)acetamido]-1*H*-tetrazol-5-yl}thio)acetamide (6b)**		
0.552	0.060	Ингибитор фактора транскрипции Transcription factor inhibitor
0.522	0.074	Ингибитор альфа-глюкозидазы Alpha-glucosidase inhibitor
0.514	0.013	Антинейропатический Antineurogenic pain
0.466	0.015	Лечение зависимости Dependence treatment
0.466	0.096	Ингибитор ДНК-полимеразы бета DNA polymerase beta inhibitor

Следовательно, предложенные нами гибридные соединения, сочетающие несколько азотсодержащих гетероциклических фрагментов в молекулярной структуре, с высокой вероятностью могут обладать выраженной мультитаргетной активностью и представлять интерес для разработки лекарственных средств с повышенной клинической эффективностью и улучшенным профилем безопасности по сравнению с лекарственными средствами монотаргетного действия.

Поскольку результаты PASS-анализа указали на значимую вероятность противодиабетического действия исследуемых соединений, следующим этапом стала их более детальная оценка с использованием молекулярного докинга. Количественная оценка биологической активности синтезированных соединений была проведена с использованием программного пакета AutoDock Vina [12]. Указанная методика высокопроизводительного виртуального скрининга дает возможность прогнозирования наиболее энергетически благоприятной конформации и локализации лиганда в сайте связывания белка-мишени, а также количественной оценки свободной энергии связывания (docking score). Данная оценочная функция учитывает ван-дер-ваальсовы, электростатические, водородные и прочие виды взаимодействий. Увеличение абсолютного значения энергии коррелирует с повышением прочности связывания лиганда с мишенью, что свидетельствует о его потенциально более высокой активности. Статистически значимыми принято считать значения в интервале от –6 ккал/моль и выше по модулю. В рамках программного обеспечения предусмотрена также функция визуализации сформированных молекулярных комплексов.

В качестве белка-мишени был выбран PPAR-γ-рецептор (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PDB: 1i7i), играющий ключевую роль в регуляции углеводного обмена и являющийся известной фармакологической мишенью антидиабетических препаратов. Применение метода AutoDock Vina позволило определить конформации лигандов в активном центре рецептора и рассчитать энергии их связывания (рисунок 3), что обеспечивает количественную характеристику предполагаемой активности.

Проведенное компьютерное моделирование выявило выраженную прогнозируемую противодиабетическую активность у синтезированных соединений по отношению к ферменту PPAR-γ. Известно, что активация данного рецептора играет ключевую роль не только в регуляции углеводного, но и в модуляции липидного обмена, а в контексте разработки новых мультитаргетных фармакологических агентов [13] данный факт представляет значительный интерес для изучения влияния данных соединений на иные ключевые компоненты метаболического процесса. В проведенных нами ранее исследованиях соединение **3b** проявило эффект снижения жировой ткани у испытуемой группы мышей [8]. Поэтому для проверки предположения о проявлении гиполипидемической активности был проведен дополнительный анализ на мишени HMG-CoA reductase (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, PDB: 1t02) – ключевом ферменте, ингибируемом для снижения уровня холестерина, и мишени MGAM (Maltase-glucoamylase, PDB: 2qmj), ферменте класса альфа-глюкозидаз, участвующем в процессе гидролиза углеводов в пищеварительной системе. Результаты общего компьютерного моделирования для соединений **2b–6b** на модели представлены в таблице 2.

Результаты *in-silico*-исследований показали, что все исследуемые соединения способны образовывать устойчивые связи со всеми выбранными мишенями, демонстрируя энергии связывания выше пороговых значений (–6 ккал/моль), и с высокой долей вероятности можно утверждать, что эти соединения могут представить интерес как средства для фармакологической коррекции метаболических нарушений. Наиболее сильное взаимодействие было установлено для соединений **2b, 6b** (–8,8 ккал/моль), что указывает на их высокую аффинность к рецептору PPAR-γ, несмотря на сравнительно низкое прогнозное значение Pa (0,522) у соединения **6b**. Такая выраженная энергия связывания с мишенями может отражать новизну структур и перспективность дальнейших исследований. Совокупность полученных данных позволяет рекомендовать соединения **2b–6b** для *in-vivo*-исследования их противодиабетической и гиполипидемической активности.

In-vivo-исследование биологической активности

Объектом исследования являются производные 5-фенилтетразола: *N*′-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2ил)-ацетогидразид (**2b**), *N*-(3-меркапто-4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)ацетамид (**3b**), *N*-(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**4b**) и *N*-(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**5b**). *N*-трет-бутил-2-({1-[2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)ацетамидо]-1*H*-тетразол-5-ил}тио)ацетамид (**6b**), по данным *in-silico*-прогноза, рекомендован для расширенного исследования полифункциональной биологической активности В настоящее время

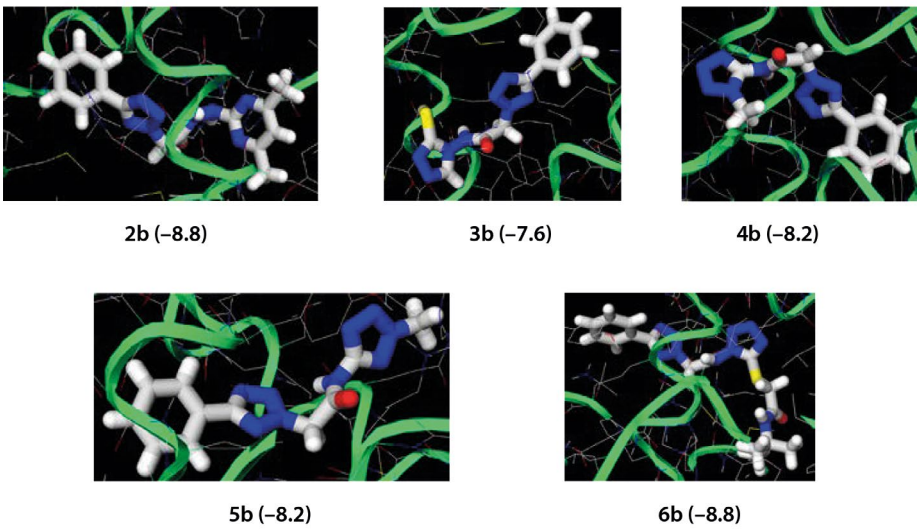


Рисунок 3. Позиционирование и энергия докинг-взаимодействий (ккал/моль) производных 5-фенилтетразола 2b–6b с мишенью PPAR-γ

Figure 3. Positioning and the energy of docking interactions (kcal/mol) of 5-phenyltetrazole derivatives 2b–6b with the PPAR-γ target

Таблица 2. Энергии связывания (ккал/моль) с активными сайтами PPAR-γ, MGAM, HMG-CoA reductase соединений 2b–6b

Table 2. Positioning and the energy of docking interactions (kcal/mol) of 5-phenyltetrazole derivatives 2b–6b with the PPAR-γ target

Номер соединения Compound number	Противодиабетическая активность Antidiabetic activity		Гиполипидемическая активность Hypolipidemic activity
	PPAR-γ	MGAM	HMG-CoA reductase
N'-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетогидразид (**2b**) *N*'-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetohydrazide (**2b**)	–8.8	–8.2	–7.6
N-(3-меркапто-4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**3b**) *N*-(3-mercapto-4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide (**3b**)	–7.6	–7.5	–6.7
N-(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**4b**) *N*-(1-methyl-1*H*-tetrazol-5-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide (**4b**)	–8.2	–7.5	–6.9
N-(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**5b**) *N*-(2-methyl-2*H*-tetrazol-5-yl)-2-(5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)-acetamide (**5b**)	–8.2	–7.3	–6.8
N-трет-бутил-2-({1-[2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)ацетамидо]-1*H*-тетразол-5-ил}тио)ацетамид (**6b**) N-tert-butyl-2-({1-[2-(5-phenyl-2H-tetrazol-2-yl)acetamido]-1H-tetrazol-5-yl}thio)acetamide (**6b**)	–8.8	–7.4	–7.6

соединение успешно проходит соответствующее тестирование *in vivo*. Результаты тестирования соединения **6b** будут опубликованы позднее.

Изучение гипогликемической активности соединений **3b** и **2b** проводилось на 32 черных мышах линии C57Bl/Ks-db+/+m (*db/db*). Прирост массы тела экспериментальных животных до 6 недели эксперимента не отличался между группами, однако с 7 недели наблюдается статистически значимое расхождение между массой животных в контрольной группе и группах **3b** и **2b** ($*p < 0,05$) с сохранением динамики на следующей неделе. В группе референтного препарата расхождения по массе тела по сравнению с группой контроля наблюдались только на 8 неделе эксперимента ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$) (рисунок 4).

В ходе импендансометрического анализа были установлены сопоставимые результаты между группами, получавшими соединения **3b** и **2b**, и группой референтного препарата. Содержание жировой ткани в организме животных к 8 неделе эксперимента отличалось: **3b** – (24,99 ± 1,70) %, **2b** – (25,56 ± 1,33) % и референт – (22,95 ± 3,57) % – по сравнению с контролем (30,73 ± 2,46 %, $p_1 = 0,027$, $p_2 = 0,031$, $p_3 = 0,0092$) (рисунок 5).

Данный феномен требует дальнейшего исследования, имеет смысл продолжение исследования с переориентацией с сахарного диабета 2-го типа на ожирение по данным субстанциям. Интерес представляет тот факт, что, по-видимому, эффективность при ожирении не связана с гипогликемическим эффектом, в отличие от сенситайзера метформина.

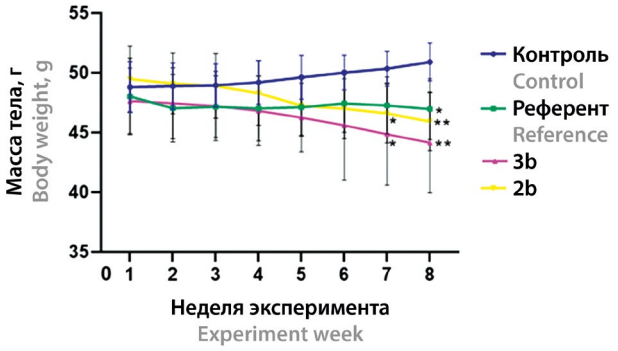


Рисунок 4. Значения масс тела для групп, получавших соединения 2b и 3b; значения порога статистической значимости (p): $*p < 0,05$, $**p < 0,01$

Figure 4. Body weight values for groups treated with compounds 2b and 3b; statistical significance threshold (p-value): $*p < 0.05$, $**p < 0.01$

Анализ концентрации глюкозы в крови животных показал гипогликемический эффект субстанции **2b** ($p_1 = 0,035$) (рисунок 6), в то время как субстанция **3b** оказала минимальное гипогликемическое действие.

Исследование гипогликемической активности субстанции **2b** проведено на 15 белых аутбредных самцах крыс с использованием адреналиновой модели

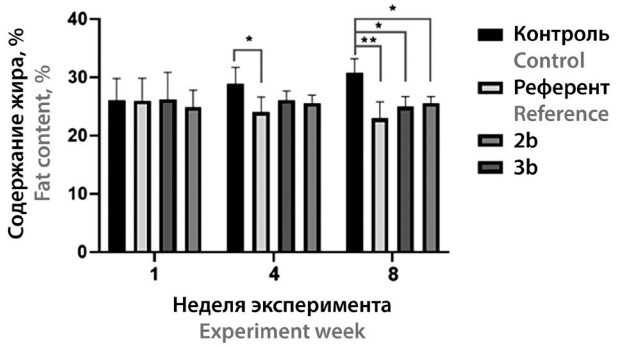


Рисунок 5. **Значения массовой доли жира для групп, получавших соединения 2b и 3b; значения порога статистической значимости (*p*): **p* < 0,05, ***p* < 0,01**

Figure 5. **Fat mass percentage values for groups treated with compounds 2b and 3b; statistical significance threshold (*p*-value): **p* < 0.05, ***p* < 0.01**

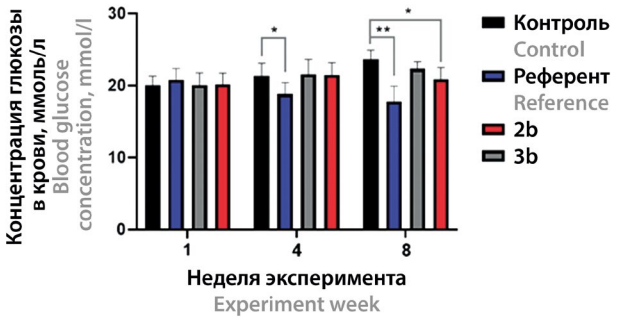


Рисунок 6. **Значения изменения уровня глюкозы в крови с течением времени для групп, получавших соединения 2b и 3b; значения порога статистической значимости (*p*): **p* < 0,05, ***p* < 0,01**

Figure 6. **Blood glucose level change over time for groups treated with compounds 2b and 3b; statistical significance threshold (*p*-value): **p* < 0.05, ***p* < 0.01**

гипергликемии [14]. Результаты измерений представлены в таблице 3.

Испытуемая субстанция проявляет в проведенном исследовании гипогликемическую активность в дозе 100 мг/кг, сравнимую с таковой у референтного препарата.

Исследование фармакологических эффектов субстанций **4b** и **5b** проведено на 20 черных мышах линии C57BL/Ks-db+/+m при многократном 14-дневном внутрижелудочном введении в виде водной суспензии с предварительным растворением в ДМСО. Результаты представлены на рисунках 7, 8.

Ежедневное введение исследуемых субстанций в течение 2 недель приводит к статистически значимому снижению уровня глюкозы в крови испытуемых животных в группах, получавших вещества **4b** и **5b**, причём сила гипогликемического эффекта в данных группах превышала таковую в группе референтного препарата метформина. Однако введения препаратов в течение 14 дней недостаточно для статистически значимого снижения уровня гликированного гемоглобина в крови, как и для референтного препарата, что требует дальнейшего изучения на более длительных сроках.

Как и другие производные 5-фенилтетразола, субстанции **4b** и **5b** показали эффективность в снижении массы тела испытуемых животных уже через 2 недели после начала эксперимента. Масса тела в группах отличалась: **4b** – (40,31 ± 2,05) %, **5b** – (40,19 ± 3,14) % и референт – (43,15 ± 1,24) % – по сравнению с контролем (48,2 ± 2,13) %, $p_1 < 0{,}001$, $p_2 = <0{,}0001$, $p_3 = 0{,}005$) (рисунок 7).

Аналогичная картина наблюдается в отношении результатов биоимпедансометрии. Группы по

Таблица 3. **Уровень глюкозы в крови (ммоль/л) в условиях адреналиновой гипергликемии после однократного внутижелудочного введения вещества 2b крысам**

Table 3. **Blood glucose level (mmol/L) under conditions of adrenergic hyperglycemia after a single intragastric administration of compound 2b to rats**

Группа животных Animal group	**Концентрация глюкозы в крови (ммоль/л)** Blood glucose concentration (mmol/L)			
	Исходное Baseline	**После введения адреналина** After adrenaline administration		
		Через 1 час 1 hours	**Через 2 часа** 2 hours	**Через 3 часа** 3 hours
Контрольная группа (*n* = 5) Control group (*n* = 5)	6,32 ± 0,37	13,44 ± 1,76*	16,42 ± 2,02*	20,36 ± 3,73*
Метформин (300 мг/кг) (*n* = 5) Metformin (300 mg/kg) (*n* = 5)	6,52 ± 0,49	7,2 ± 1,65*	8,6 ± 2,40*	6,9 ± 1,07*
2b (100 мг/кг) (*n* = 5) **2b** (100 mg/kg) (*n* = 5)	5,56 ± 0,34	7,78 ± 2,46*	8,00 ± 2,25*	8,92 ± 1,78*

Примечание. * Значение p в сравнении с контрольной группой ($p < 0{,}01$).

Note. * Value is statistically significant compared to the control group ($p < 0.01$).

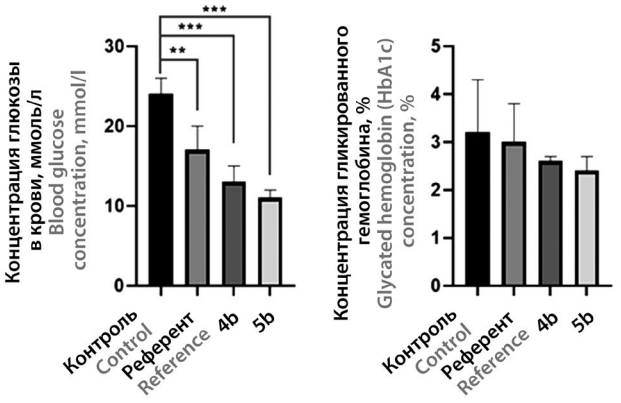


Рисунок 7. Значения изменения уровня глюкозы в крови с течением времени для групп, получавших соединения 4b и 5b; значения порога статистической значимости (*p*): **$p < 0{,}01$, ***, $p < 0{,}001$

Figure 7. Blood glucose level change over time for groups treated with compounds 4b and 5b; statistical significance threshold (*p*-value): **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

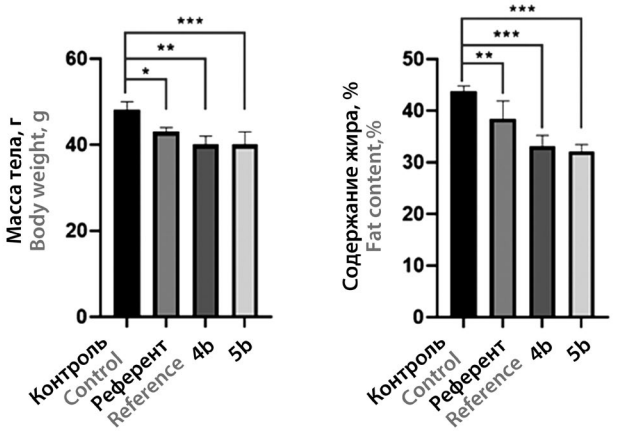


Рисунок 8. Значения масс тела и содержания жира с течением времени для групп, получавших соединения 4b и 5b; значения порога статистической значимости (*p*): *$p < 0{,}05$, **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}001$

Figure 8. Body weight and fat content over time for groups treated with compounds 4b and 5b; statistical significance threshold (*p*-value): *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$

содержанию жира на конец эксперимента различаются: **4b** – (33,1 ± 2,12) %, **5b** – (32,14 ± 1,28) % и референт – (38,43 ± 3,47) % – по сравнению с контролем (43,76 ± 1,07) %, $p_1 < 0{,}0001$, $p_2 = <0{,}0001$, $p_3 = 0{,}004$) (рисунок 7).

Таким образом, проведенная оценка выявила значительные различия в фармакологическом профиле исследуемых производных 5-фенилтетразола. По силе гипогликемического действия соединения образуют следующий ряд: **4b** ≈ **5b** > **2b** ≈ метформин > **3b**. Выявленная зависимость хорошо согласуется с опубликованными данными, что модификация структуры гетероциклических соединений позволяет целенаправленно менять их биологическую активность [15]. При этом все производные, в отличие от метформина, продемонстрировали выраженное самостоятельное влияние на массу тела и долю жировой ткани, что указывает на различие в механизмах действия. Эффект метформина на массу тела, по-видимому, является вторичным следствием улучшения чувствительности к инсулину [16], тогда как исследуемые соединения (особенно **3b**, **4b**, **5b**) оказывают прямое воздействие на метаболизм липидов, не всегда коррелирующее с их гипогликемической активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования производных 5-фенилтетразола была доказана биологическая активность в направлении коррекции различных метаболической нарушений. Соединение *N*′-(4,6-диметилпиримидин-2-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетогидразид (**2b**) представляет наибольший интерес как комплексный агент для терапии сахарного диабета 2-го типа, сочетающий сопоставимый с метформином гипогликемический эффект и благоприятное влияние на массу тела. Соединения *N*-(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**4b**) и *N*-(2-метил-1*H*-тетразол-5-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**5b**) являются многообещающими кандидатами, так как в краткосрочном эксперименте их активность в отношении массы тела и уровня сахара в крови превзошла эталонный препарат. В свою очередь, соединение *N*-(3-меркапто-4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)-ацетамид (**3b**), несмотря на слабый гипогликемический эффект, показало значительный потенциал для коррекции массы тела и лечения ожирения, возможно, благодаря механизму, независимому от углеводного обмена. На основании полученных данных можно выделить перспективные направления для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Островский В. А., Мирон С. Б., Павлюкова Ю. Н. Взгляд химика-технолога на импортозамещение лекарственных средств. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2023;72(12):3037–3051.
2. IDF Diabetes Atlas: International Diabetes Federation Diabetes Atlas. 10th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2021.
3. Chatterjee S., Khunti K., Davies M. J. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2017;389:2239–2251. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30058-2.
4. Ruze R., Liu T., Zou X., Song J., Chen Yu., Xu R., Yin X., Xu Q. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1161521. DOI: 10.3389/fendo.2023.1161521.
5. Popova E. A., Trifonov R.E., Ostrovskii V. A. Tetrazoles for biomedicine. *Russian Chemical Reviews*. 2019;88(6):644–676. DOI: 10.1070/RCR4864.

6. Kaplanskiy M. V., Faizullina O. E., Trifonov R. E. Experimental and Theoretical Quantitative Studies of the Hydrogen Bonding Basicity of 2,5-Disubstituted Tetrazoles and Some Related Heterocycles. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2023;127(26):5572–5579. DOI: 10.1021/acs.jpca.3c02931.
7. Trifonov R. E., Ostrovskii V. A. Tetrazoles and Related Heterocycles as Promising Synthetic Antidiabetic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(24):17190. DOI: 10.3390/ijms242417190.
8. Островский В. А., Шманёва Н. Т., Ершов И. С., Антоненко Д. В., Скрыльникова М. А., Храмчихин А. В., Чернова Е. Н., Гришина А. Ю., Анисимова Н. А., Напалкова С. М., Буюклинская О. В., Мажай В. С., Павлюкова Ю. Н., Трифонов Р. Е. Хлорангидрид (5-фенилтетразол-2-ил)уксусной кислоты как ключевой реагент синтеза неаннелированных полиядерных тетразолсодержащих соединений с потенциальной противодиабетической активностью. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 202;73(7):1977–1983.
9. Suriano F., Vieira-Silva S., Falony G., Roumain M., Paquot A., Pelicaen R., Régnier M., Delzenne N. M., Raes J., Muccioli G. G., Van Hul M., Cani P. D. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*. 2021;9(1):147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
10. Поройков В. В., Филимонов Д. А., Глориозова Т. А., Лагунин А. А., Дружиловский Д. С., Рудик А. В., Столбов Л. А., Дмитриев А. В., Тарасова О. А., Иванов С. М., Погодин П. В. Компьютерный прогноз спектров биологической активности органических соединений: возможности и ограничения. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2019;12:2143–2154.
11. Поройков В. В. Компьютерное конструирование лекарств: от поиска новых фармакологических веществ до системной фармакологии. *Биомедицинская химия*. 2020;66(1):30–41. DOI: 10.18097/PBMC20206601030.
12. Trott O., Olson A. J. "AutoDock Vina": improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010;31:455–461.
13. Kroker A. J., Bruning J. B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPARγ Partial Agonism. *PPAR Research*. 2015;2015:816856. DOI: 10.1155/2015/816856.
14. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
15. Jain A. K., Vaidya A., Ravichandran V., Kashaw S. K., Agrawal R. K. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012;20(11):3378–3395. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.069.
16. Foretz M., Guigas B., Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(10):569–589. DOI: 10.1038/s41574-019-0242-2.

REFERENCES

1. Ostrovskii V. A., Miron S. B., Pavlyukova Yu. N. A process chemist's perspective on import substitution of pharmaceuticals. *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Khimicheskaya*. 2023;72(12):3037–3051. (In Russ.).
2. IDF Diabetes Atlas: International Diabetes Federation Diabetes Atlas. 10th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2021.
3. Chatterjee S., Khunti K., Davies M. J. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2017;389:2239–2251. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30058-2.
4. Ruze R., Liu T., Zou X., Song J., Chen Yu., Xu R., Yin X., Xu Q. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1161521. DOI: 10.3389/fendo.2023.1161521.
5. Popova E. A., Trifonov R.E., Ostrovskii V. A. Tetrazoles for biomedicine. *Russian Chemical Reviews*. 2019;88(6):644–676. DOI: 10.1070/RCR4864.
6. Kaplanskiy M. V., Faizullina O. E., Trifonov R. E. Experimental and Theoretical Quantitative Studies of the Hydrogen Bonding Basicity of 2,5-Disubstituted Tetrazoles and Some Related Heterocycles. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2023;127(26):5572–5579. DOI: 10.1021/acs.jpca.3c02931.
7. Trifonov R. E., Ostrovskii V. A. Tetrazoles and Related Heterocycles as Promising Synthetic Antidiabetic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(24):17190. DOI: 10.3390/ijms242417190.
8. Ostrovskii V. A., Shmaneva N. T., Ershov I. S., Antonenko D. V., Skrylʹnikova M. A., Khramchikhin A. V., Chernova E. N., Grishina A. Yu., Anisimova N. A., Napalkova S. M., Buyuklinskaya O. V., Mazhai V. S, Pavlyukova Yu. N., Trifonov R. E. 2-(5-Phenyl-2H-tetrazol-2-yl)acetyl chloride as a key reagent in the synthesis of non-annulated polynuclear tetrazole-containing compounds with potential antidiabetic activity. *Russian Chemical Bulletin*. 2024;73(7):1977–1983. (In Russ.)
9. Suriano F., Vieira-Silva S., Falony G., Roumain M., Paquot A., Pelicaen R., Régnier M., Delzenne N. M., Raes J., Muccioli G. G., Van Hul M., Cani P. D. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*. 2021;9(1):147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
10. Poroikov V. V., Filimonov D. A., Gloriozova T. A., Lagunin A. A., Druzhilovsky D. S., Rudik A. V., Stolbov L. A., Dmitriev A. V., Tarasova O. A., Ivanov S. M., Pogodin P. V. Computer prediction of spectra of biological activity for organic compounds: possibilities and limitations. *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Khimicheskaya*. 2019;12:2143–2154. (In Russ.)
11. Poroikov V. V. Computer-Aided Drug Design: from Discovery of Novel Pharmaceutical Agents to Systems Pharmacology. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2020;66(1):30–41. (In Russ.) DOI: 10.18097/PBMC20206601030.
12. Trott O., Olson A. J. "AutoDock Vina": improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010;31:455–461.
13. Kroker A. J., Bruning J. B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPARγ Partial Agonism. *PPAR Research*. 2015;2015:816856. DOI: 10.1155/2015/816856.
14. Mironov A. N., Bunatyan N. D. Guidance for conducting preclinical studies of medicinal products. Part one. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
15. Jain A. K., Vaidya A., Ravichandran V., Kashaw S. K., Agrawal R. K. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012;20(11):3378–3395. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.069.
16. Foretz M., Guigas B., Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(10):569–589. DOI: 10.1038/s41574-019-0242-2.

Research article / Оригинальная статья

UDC 615.322

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2107

Check for updates

CC BY 4.0

Comparison of antioxidant activity of dihydroquercetin samples with different diastereomeric composition

Roman P. Terekhov[1]✉, Igor R. Ilyasov[1], Bo Li[2], Youyan Zeng[2], Denis I. Pankov[1], Artem A. Svotin[1], Vera V. Olicheva[1], Diana R. Kolesnikova[1], Valery F. Goman[1], Maria D. Korochkina[1], Irina A. Selivanova[1]

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

[2] Guangdong Metabolic Diseases Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine (Institute of Chinese Medicine). MOE Key Laboratory of Glucolipid Metabolic Disorder. Guangdong TCM Key Laboratory for Metabolic Diseases. Guangdong Pharmaceutical University. 280, Wai Huan Dong str., Guangzhou, 510006, China

✉ **Corresponding author:** Roman P. Terekhov. **E-mail:** terekhov_r_p@staff.sechenov.ru

ORCID: Roman P. Terekhov – https://orcid.org/0000-0001-9206-8632;
Igor R. Ilyasov – https://orcid.org/0000-0001-9822-3322;
Bo Li – https://orcid.org/0000-0002-2812-1328;
Youyan Zeng – https://orcid.org/0009-0009-7262-3833;
Denis I. Pankov – https://orcid.org/0009-0007-6195-6400;
Artem A. Svotin – https://orcid.org/0009-0001-5360-8816;
Vera V. Olicheva – https://orcid.org/0009-0004-6866-218X;
Diana R. Kolesnikova – https://orcid.org/0009-0002-4447-7225;
Valery F. Goman – https://orcid.org/0009-0006-2250-3671;
Maria D. Korochkina – https://orcid.org/0000-0002-2790-9041;
Irina A. Selivanova – https://orcid.org/0000-0002-2244-445X.

Received: 28.05.2025 **Accepted:** 12.02.2026 **Published:** 13.02.2026

Abstract

Introduction. Flavanonol dihydroquercetin (DHQ) is known for its pronounced antioxidant properties, which are associated with a wide range of biological activity of this compound. Due to the presence of two chiral centers at positions 2 and 3 of the benzopyranone ring, this flavonoid is characterized by the phenomenon of *cis-trans* isomerism. However, a comparative analysis of the antioxidant properties of DHQ diastereomers has not been performed before.

Aim. To evaluate the effect of diastereomeric composition on the reducing and radical scavenging properties of DHQ samples.

Materials and methods. The diastereomeric composition of the DHQ samples was controlled under reverse phase chromatography with UV detection. The antioxidant capacity was studied using a model of inhibition of radical cations of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($ABTS^{+\bullet}$). The reducing ability of the DHQ samples was evaluated using a 5-(2,4-disulfophenyl)-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2*H*-tetrazolium monosodium salt (WST-8) model. Both tests were performed under the control of UV spectrophotometry.

Results and discussion. The chromatograms of the samples obtained at 288 nm are characterized by two peaks with retention times of 18.79 ± 0.08 and 19.87 ± 0.08 min, which correspond to *trans*- and *cis*-diastereomers of DHQ. After 6 minutes of DHQ samples containing 0.8, 3.7, and 9.5 % of the *cis*-isomer adding to the $ABTS^{\bullet+}$ solution, the optical density at 730 nm decreased by 0.588 ± 0.008, 0.581 ± 0.017, and 0.602 ± 0.012, respectively (α 0.05, *p* 0.2196, *r* 0.7857), while in WST-8 solutions at 450 nm for similar samples, an increase in optical density was observed by 0.178 ± 0.030, 0.222 ± 0.026, and 0.188 ± 0.036, respectively (α 0.05, *p* 0.5157, *r* 0.0284).

Conclusion. These results indicate that there is no significant effect of the diastereomeric composition on the antioxidant properties of the DHQ samples. Thus, the observed differences in the pharmacology of *cis*- and *trans*-DHQ should be explained by the selectivity of interaction with biological targets, rather than the free radicals scavenging activity.

Keywords: dihydroquercetin, flavonoids, diastereomerism, antioxidants, HPLC

© Terekhov R. P., Ilyasov I. R., Li B., Zeng Y., Pankov D. I., Svotin A. A., Olicheva V. V., Kolesnikova D. R., Goman V. F., Korochkina M. D., Selivanova I. A., 2026

© Терехов Р. П., Ильясов И. Р., Ли Б., Цзэн Ю., Панков Д. И., Свотин А. А., Оличева В. В., Колесникова Д. Р., Гоман В. Ф., Корочкина М. Д., Селиванова И. А., 2026

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. Roman P. Terekhov – formal analysis, project and data administration, funding acquisition, original draft preparation. Igor R. Ilyasov – formal analysis, methodology, validation, review and editing. Bo Li – funding acquisition, methodology, validation, review and editing. Youyan Zeng – investigation, review and editing. Denis I. Pankov – methodology, validation, investigation, visualization, review and editing. Artem A. Svotin – investigation, review and editing. Vera V. Olicheva – investigation, review and editing. Diana R. Kolesnikova – investigation, review and editing. Valery F. Goman – investigation, review and editing. Maria D. Korochkina – investigation, original draft preparation. Irina A. Selivanova – conceptualization, supervision, review and editing.

Funding. The This work was financed by the Russian Science Foundation No 23-75-01130 (HPLC, $ABTS^{+\bullet}$ test) and by The Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province No 20241171 (WST-8 test).

For citation: Terekhov R. P., Ilyasov I. R., Li B., Zeng Y., Pankov D. I., Svotin A. A., Olicheva V. V., Kolesnikova D. R., Goman V. F., Korochkina M. D., Selivanova I. A. Comparison of antioxidant activity of dihydroquercetin samples with different diastereomeric composition. *Drug development & registration*. 2026;15(1):43–52. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2107

Сравнение антиоксидантной активности образцов дигидрокверцетина с различным диастереомерным составом

Р. П. Терехов[1]✉, И. Р. Ильясов[1], Б. Ли[2], Ю. Цзэн[2], Д. И. Панков[1], А. А. Свотин[1], В. В. Оличева[1], Д. Р. Колесникова[1], В. Ф. Гоман[1], М. Д. Корочкина[1], И. А. Селиванова[1]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Гуандунский исследовательский центр метаболических заболеваний объединенной китайской и западной медицины (Институт китайской медицины). Центральная лаборатория гликолипидных метаболических нарушений Министерства образования КНР. Гуандунская центральная лаборатория метаболических заболеваний традиционной китайской медицины. Гуандунский фармацевтический университет. 510006, Китай, г. Гуанчжоу, ул. Вай Хуан Донг, д. 280

✉ **Контактное лицо:** Терехов Роман Петрович. **E-mail:** terekhov_r_p@staff.sechenov.ru

ORCID: Р. П. Терехов – https://orcid.org/0000-0001-9206-8632;
И. Р. Ильясов – https://orcid.org/0000-0001-9822-3322;
Б. Ли – https://orcid.org/0000-0002-2812-1328;
Ю. Цзэн – https://orcid.org/0009-0009-7262-3833;
Д. И. Панков – https://orcid.org/0009-0007-6195-6400;
А. А. Свотин – https://orcid.org/0009-0001-5360-8816;
В. В. Оличева – https://orcid.org/0009-0004-6866-218X;
Д. Р. Колесникова – https://orcid.org/0009-0002-4447-7225;
В. Ф. Гоман – https://orcid.org/0009-0006-2250-3671;
М. Д. Корочкина – https://orcid.org/0000-0002-2790-9041;
И. А. Селиванова – https://orcid.org/0000-0002-2244-445X.

Статья поступила: 28.05.2025 **Статья принята в печать:** 12.02.2026 **Статья опубликована:** 13.02.2026

Резюме

Введение. Флаванонол дигидрокверцетин (ДКВ) известен выраженной антиоксидантной способностью, с которой связывают широкий спектр биологической активности данного соединения. Благодаря наличию двух центров хиральности в положениях 2 и 3 бензопиранонового кольца, для этого флавоноида характерно явление *цис-транс*-изомерии. Однако сопоставительный анализ антиоксидантной способности диастереомеров ДКВ ранее не осуществляли.

Цель. Оценить влияние диастереомерного состава на восстанавливающие и радикал-связывающие свойства образцов ДКВ.

Материалы и методы. Диастереомерный состав испытуемых образцов ДКВ контролировали в условиях обращенно-фазовой хроматографии с УФ-детектированием. Изучение антиоксидантной емкости осуществляли на модели ингибирования радикал-катионов 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевой соли ($ABTS^{+\bullet}$). Восстанавливающую способность образцов ДКВ оценивали на модели 5-(2,4-дисульфофенил)-3-(2-метокси-4-нитрофенил)-2-(4-нитрофенил)-2*H*-тетразолия мононатриевой соли (WST-8). Оба испытания проводили под контролем спектрофотомерии в УФ-области.

Результаты и обсуждение. Хроматограммы образцов, полученные при длине волны 288 нм, характеризуются двумя пиками с временами удерживания 18,79 ± 0,08 и 19,87 ± 0,08 мин, которые соответствуют *транс*- и *цис*-диастереомерам ДКВ. При добавлении к раствору $ABTS^{\bullet+}$ образцов ДКВ, содержащих 0,8, 3,7 и 9,5 % *цис*-изомера, оптическая плотность при 730 нм по истечении 6 мин снизилась на 0,588 ± 0,008, 0,581 ± 0,017 и 0,602 ± 0,012, соответственно (α 0,05, *p* 0,2196, *r* 0,7857), в то время как в растворах WST-8 при 450 нм для аналогичных образцов наблюдали увеличение оптической плотности на 0,178 ± 0,030, 0,222 ± 0,026 и 0,188 ± 0,036, соответственно (α 0,05, *p* 0,5157, *r* 0,0284).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии статистически значимого влияния диастереомерного состава на антиоксидантные свойства образцов ДКВ. Таким образом, наблюдаемые различия в фармакологии *цис-* и *транс*-ДКВ следует объяснять селективностью взаимодействия с биологическими мишенями, а не способностью связывать свободные радикалы.

Ключевые слова: дигидрокверцетин, флавоноиды, диастереомерия, антиоксиданты, ВЭЖХ

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

Вклад авторов. Р. П. Терехов – формальный анализ, администрирование данных и проекта, получение финансирования, создание и редактирование черновика рукописи. И. Р. Ильясов – методология, формальный анализ, верификация данных, редактирование рукописи. Б. Ли – получение финансирования, методология, верификация данных, редактирование рукописи. Ю. Цзэн – проведение исследования, редактирование рукописи. Д. И. Панков – методология, верификация данных, проведение исследования, визуализация, редактирование рукописи. А. А. Свотин – проведение исследования, редактирование рукописи. В. В. Оличева – проведение исследования, редактирование рукописи. Д. Р. Колесникова – проведение исследования, редактирование рукописи. В. Ф. Гоман – проведение исследования, редактирование рукописи. М. Д. Корочкина – проведение исследования, создание и редактирование черновика рукописи. И. А. Селиванова – концептуализация, руководство исследованием, редактирование рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-01130 (хроматография, тест с $ABTS^{+\bullet}$) и финансирования традиционной китайской медицины в провинции Гуандун № 20241171 (тест с WST-8).

Для цитирования: Терехов Р. П., Ильясов И. Р., Ли Б., Цзэн Ю., Панков Д. И., Свотин А. А., Оличева В. В., Колесникова Д. Р., Гоман В. Ф., Корочкина М. Д., Селиванова И. А. Сравнение антиоксидантной активности образцов дигидрокверцетина с различным диастереомерным составом. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):43–52. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2107

INTRODUCTION

Flavonoids are widespread in medicinal plants and their content is often used as a quality indicating parameter of active pharmaceutical ingredients of plant origin [1–3]. The wide range of biological activity of this natural polyphenol group is usually explained by their pronounced antioxidant properties [4]. However, the characteristics of the stereochemical structure of various flavonoids are rarely taken into account by researchers.

One of the representatives of this group of compounds is the flavanonol dihydroquercetin (DHQ) – 2,3-dihydro-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-one. The industrial source for obtaining this compound is larch wood, but it can also be extracted from other plant objects: *Artemisia martjanovii* Krasch [5], *Dracocephalum jacutense* P. [6], *Rhododendron mucronulatum* Turcz. [7], etc. Recently, biotechnological approaches to obtaining DHQ have been actively developed [8–9].

Due to the presence of two chiral centers in positions 2 and 3 of the benzopyranone ring, this flavonoid is characterized by the phenomenon of *cis-trans* isomerism. On the one hand, this leads to the need of introducing new quality indicators for drugs based on it [10]. On the other hand, there are data in the scientific literature reporting differences between DHQ diastereomers in pharmacokinetic [11–12] and pharmacodynamic profiles [13-14]. One of the possible reasons for the emergence of these differences may be the non-equivalence of the antioxidant properties of diastereomers, as one of the most important types of biological activity of flavonoids. However, according to our data, a comparative analysis of the antioxidant capacity of DHQ diastereomers has not been carried out previously.

Thus, the aim of the study is to evaluate the influence of diastereomeric composition on the reducing and radical scavenging properties of DHQ samples.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The objects of the current study were three samples of DHQ: sample I – LLC "Robios", Russia; sample II – JSC "Ametis", Russia; sample III was obtained by spray drying from sample II according to the previously described conditions [15].

The model compounds employed to evaluate the antioxidant properties were 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (Acros Organics, Belgium) and 5-(2,4-disulfophenyl)-3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2*H*-tetrazolium monosodium salt (WST-8) in a cell counting kit

(CCK-8, Selleck Chemicals, USA). Potassium peroxydisulfate (Acros Organics, Belgium) was also used as a reagent. Methanol (for HPLC, LLC «Aquametriya», Russia), denatured ethyl alcohol (99.8 %, Carl ROTH GmbH, Germany), purified and deionized water, phosphate buffered saline system, pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) – 1X, Gibco, USA – acted as solvents, and acetic acid (96 %, "for analysis", Merck KGaA, Germany) was applied as an acid modifier in chromatography.

Chromatography

The LicArt 62 chromatographic system (LLC "Labconcept", Russia) consisted of a QP-62d pump, T-85 thermostat, UV-62 spectrophotometric detector, 7725i injector, and Zorbax 3.5 μm SB-Phenyl 4.6 × 150 mm column (Agilent Technologies, USA). Mobile phase: A – acetic acid solution in water (pH 2.7), B – methanol. Elution was carried out in a gradient mode: from 71 % (0 min) to 55 % (30 min) of component A. The column temperature varied from 30 to 60 °C (step – 15 °C), and the flow rate from 0.2 to 0.8 ml/min. The UV detector recorded data at the absorption maximum of DHQ at a wavelength of 288 nm. The test sample was a water-methanol (1 : 1, vol.) solution of DHQ with a concentration of 0.05 mg/ml.

The efficiency of the chromatographic system was assessed by the resolution value (R_s) between the peaks of the diastereomers of DHQ, determined in accordance with GPM.1.2.1.2.0001 "Chromatography" (State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV) using the formula:

$$R_s = \frac{1.18\,(RT_1 - RT_2)}{(W_1^{50\,\%} + W_2^{50\,\%})},$$

where RT_1 and RT_2 are retention times of peaks of DHQ diastereomers (min), and $W_1^{50\,\%}$ and $W_2^{50\,\%}$ are the widths of these peaks at half their height (min). The asymmetry factor (A_s) was determined as follows:

$$A_s = \frac{W^{5\,\%}}{2 \cdot f},$$

where $W^{5\,\%}$ is the width of these peaks at 5 % of their height (min), f is the distance from the ascending side of the peak to the perpendicular dropped from its top (min).

The content of *trans*-DHQ was determined using an external standard. Quantitative analysis of the *cis*-diastereomer was performed using the internal normalization method.

The quantitative method for determining the *cis*-DHQ impurity was validated in accordance with the recommendations of GPM.1.1.0012 «Validation of analytical methods» for the characteristics «Specificity», «Accuracy», «Repeatability», «Analytical range», «Linearity», and «Limit of quantification» (State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV).

Moisture assessment

The test object weighing 1.0 g was placed on the stage of an i-Thermo GA64M (BEL Engineering s.r.l., Italy), after which the object was dried to constant mass at a temperature of 105 °C.

Antioxidant capacity

To measure the antioxidant capacity, an approach based on the preliminary generation of $ABTS^{\bullet+}$ radical cations was used [16] with a number of subsequent modifications [17–18]. Briefly, a solution of potassium peroxydisulfate with a concentration of 2.5 mmol/l in the same buffer was added to a solution of ABTS with a concentration of 7 mmol/l in PBS solution (pH 7.4) and placed in a dark place. The maximum concentration of $ABTS^{\bullet+}$ is achieved 6–8 h after the addition of the initiator. Spectrophotometric analysis was performed on a Cary 1C (Varian, USA), *l* 1.0 cm.

Working solutions of $ABTS^{\bullet+}$ were prepared in such a way that the absorption at the maximum at 730 nm was 1.00 ± 0.20 units of optical density. For this purpose, 240–260 μl of the stock solution of pre-generated $ABTS^{\bullet+}$ were added to 7.6 ml of the PBS solution. For each measurement, the absorption spectrum of the working solution of $ABTS^{\bullet+}$ was recorded in the range of 680–780 nm, then 3.3 ml of this solution was immediately taken and 20 μl of the working stock solution of the sample under study (solution B) were added to it and incubated in the dark at 30 °C for 30 min, after which the spectrum was recorded again in the same wavelength range.

Working stock solutions of the provided DHQ samples were prepared by dissolving 0.5 g (precisely weighed amount) in 20 ml of ethanol (solution A), then 7 ml of ethanol were added to 1 ml of the resulting solution (solution B).

The radical-scavenging capacity (*N*) was calculated using the formula:

$$N = \Delta A/(\varepsilon \cdot C_{DHQ} \cdot l),$$

where ΔA is the difference in optical densities of the $ABTS^{\bullet+}$ solution at a wavelength of 730 nm before adding the test sample of DHQ and 30 min after adding, ε is the molecular extinction coefficient of $ABTS^{\bullet+}$ solution at a wavelength of 730 nm (15 000 l/mol · cm), C_{DHQ} is the molar concentration of solution B, and *l* is the optical path length (1.0 cm).

Reducing ability

DMEM was distributed at 100 μl per well in a 96-well plate, after which 100 μl of the analyzed samples, dissolved in the same solvent at a concentration of 0.15 mg/ml, were added. Then 10 μl of CCK-8 were added to each well and kept for 1 hour at 37 °C in an atmosphere containing 5 % carbon dioxide and at a relative moisture of 95 %.

The resulting solutions were analyzed on an Eon microplate spectrophotometer (BioTek, USA) at the absorption maximum of the reduced form of WST-8 at 450 nm.

The reducing ability (R) was calculated using the formula:

$$R = (A_n - A_0)/A_n \cdot 100\ \%,$$

where A_n is the optical density of WST-8 solution at a wavelength of 450 nm 6 min after adding the test sample of DHQ, A_0 is the optical density of WST-8 solution at a wavelength of 450 nm without the addition of the test sample of DHQ (0.400).

Statistical processing of data

All tests were performed three times. The results are presented as mean ± confidence interval (α 0.05). To assess the statistical significance of the difference in the results obtained for different study objects, a one-way analysis of variance (α 0.05) was performed, the results of which are presented as a *p*-value. To assess the strength of the correlation between the content of the *cis*-diastereomer and the observed values, the correlation coefficient *r* was calculated.

RESULTS

The development of the analytical method based on HPLC was carried out according to the principle of maximizing the R_s value depending on the chromatography conditions (Figure 1). An inverse linear relationship was established between the temperature and the resolution between the peaks of the DHQ diastereomers (*r* –0.9882). At the same time, the flow rate had a more complex effect on the R_s value: Initially, as the flow rate increased, an increase in the resolution between the peaks of the DHQ diastereomers was observed according to a parabolic law (*r* 0.9833), which then turned into a linear decrease in this characteristic (*r* –0.9699).

As a result, the temperature of 30 °C and the flow rate of 0.464 ml/min were recognized as the most optimal conditions (R_s 2.5), the chromatogram for these parameters is shown in Figure 2. The peaks with the retention times of 17.935 ± 0.320 min and 19.038 ± 0.339 min were identified as the *trans*- and *cis*-isomers of DHQ, their asymmetry factors were 1.122 ± 0.006 and 0.999 ± 0.013, respectively. The high R_s value and the reproducibility of the peak retention times determine the specificity of the developed method. In the range of DHQ sample concentrations from 0.01 to 0.20 mg/ml, the determination coefficient R^2 was 0.9993, and the repeatability was ±1.3 %. The reference method for assessing the "Accuracy" characteristic was ^{1}H NMR spectroscopy data [19], compared to which the results of the current analysis deviated by 3.4 ± 0.1 %. Limit of quantification was 0.003 % of *cis*-DHQ amount.

Information on the quantitative content of diastereomers in the study objects is summarized in Table 1. The content of *cis*-DHQ in samples 1, 2, and 3 was 0.8, 3.7 and 9.5%, respectively.

Table 1. Content of diastereomers of DHQ in the objects of study

Sample	Moisture, %	Content of DHQ, %		
		total amount	*trans*-isomer	*cis*-isomer
I	8.5 ± 0.3	90.4 ± 1.3	89.6 ± 1.3	0.8 ± 0.1
II	7.3 ± 0.1	101.9 ± 1.5	98.2 ± 1.5	3.7 ± 0.1
III	5.0 ± 0.2	85.3 ± 1.3	75.8 ± 1.1	9.5 ± 0.1

The results of the evaluation of the radical-scavenging capacity and reducing ability of the analyzed objects on the $ABTS^{\bullet+}$ and WST-8 models are presented in Table 2. In both cases, no significant difference was found in the values of the optical density change for samples with different *cis*-diastereomer content: On the $ABTS^{\bullet+}$ and WST-8 models, the *p*-values were 0.2196 and 0.5157, respectively. At the same time, a strong positive correlation was established between the proportion of *cis*-DHQ and the *N* value (*r* 0.7857), while there was virtually no relationship with the *R* value (*r* 0.0284). In addition, there was a moderate inverse correlation between the values of radical-scavenging capacity and reducing ability (*r* –0.5627).

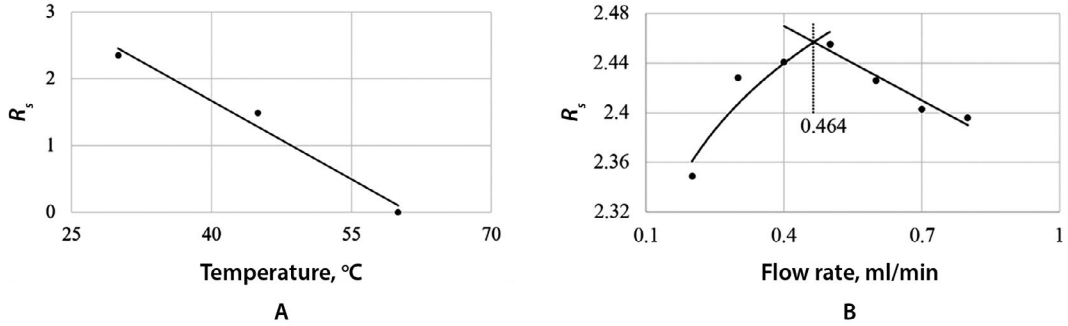


Figure 1. Optimization of chromatographic separation conditions based on R_s value:
A – temperature; B – flow rate

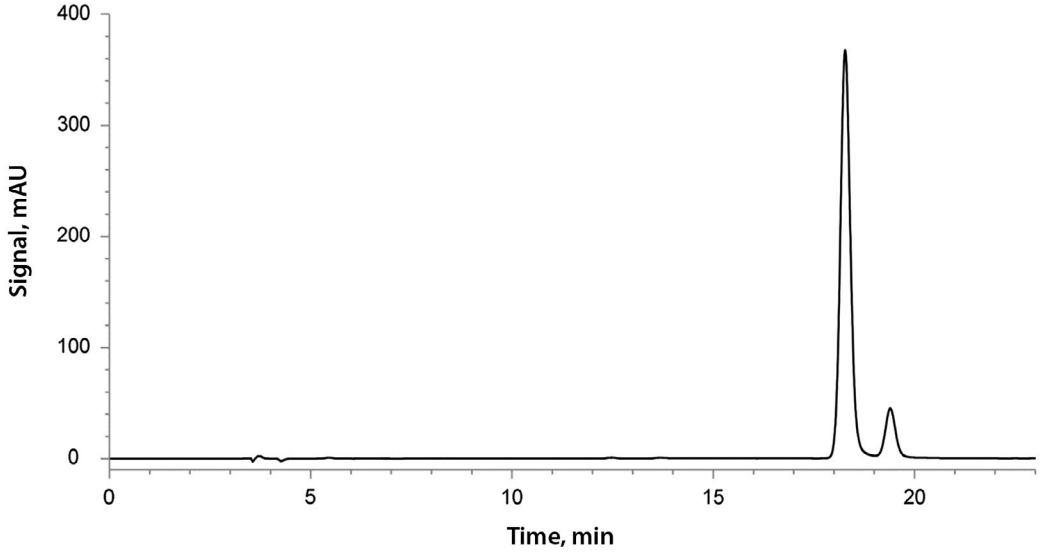


Figure 2. **Separation of diastereomers of DHQ: *trans*- and *cis*-isomer**

Table 2. **Results of tests with $ABTS^{\bullet+}$ and WST-8**

Sample	Antioxidant capacity		Reducing ability	
	ΔA	***N***	***ΔA***	***R*, %**
I	0.588 ± 0.008	6.27 ± 0.09	0.178 ± 0.030	30.8 ± 5.1
II	0.581 ± 0.017	6.20 ± 0.18	0.222 ± 0.026	35.6 ± 4.2
III	0.602 ± 0.012	6.42 ± 0.13	0.188 ± 0.036	32.0 ± 6.1

Thus, all analyzed samples of DHQ were characterized by pronounced antioxidant properties.

DISCUSSION

This study was conducted to fill the knowledge gap regarding the influence of diastereomerism on the antioxidant properties of the natural flavanonol DHQ.

Due to two chiral centers, the DHQ molecule can exist in two pairs of diastereomers: *cis*- and *trans*-isomers. Because of the similarity of the physicochemical properties of the DHQ diastereomers, their chromatographic separation under achiral conditions remained a non-trivial task. Therefore, the implementation of this scientific project required establishing the content of the *cis*-diastereomer in the analyzed DHQ samples. According to the results of the literature analysis performed earlier, quantitative methods based on HPLC are the most promising for further implementation in routine pharmaceutical practice [10]. The quantitative analysis method presented in this work is a modification of a previously developed technique [20]. The stationary phase is silica gel with attached phenyl groups, the mobile phase is a water-methanol mixture with an acid modifier (acetic acid), the elution mode is gradient. The acid modifier (pH 2.7) was added to suppress the ionization of flavanonol molecules in accordance with the established practice of chromatographic separation of flavonoids [21], preventing peak blurring, which was successfully achieved: The asymmetry factor was in the range from 0.8 to 1.8, which met the requirements of GPM.1.2.1.2.0001 "Chromatography": (State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV).

The main parameter by which the chromatography conditions were optimized was the resolution between the *trans*- and *cis*-DHQ peaks, the value of which, according to regulatory documentation, should be no less than 1.5.

The relationship between R_s and flow rate found in this study resembles the inverted curve described by the van Deemter equation [22]:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v,$$

where H is the plate height (cm), v is the flow rate (cm/min), and A, B и C are constants describing dispersion by flow (cm), dispersion by axial molecular diffusion (cm^2/min), and slow mass transfer (min), respectively. The H value is calculated using the formula:

$$H = \frac{L}{N},$$

where L is the column length (cm), and N is the number of theoretical plates. At the same time, the relationship between the values of N and R_s submits the following equation:

$$N = 16 \cdot R_s \cdot \left(\frac{K' + 1}{K'}\right)^2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2,$$

where K' is the retention factor, and α is the separation selectivity. Combining the three expressions above, we obtain the following equation:

$$\frac{L}{16 \cdot R_s \cdot \left(\frac{K'+1}{K'}\right)^2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2} = A + \frac{B}{v} + C \cdot v.$$

The column length remained constant under the experimental conditions. The retention factor depends on the temperature, as well as on the nature of the sorbent, solvent and sorbed substance, but not on the flow rate [23]. The separation selectivity, on the contrary, depends on *v* value, however, Peristyy et al. showed, as the flow rate increases, this characteristic reaches a plateau and, starting from 0.2 ml/min, its changes become negligible [24]. Thus, under the conditions of the current experiment, the influence of all three variables described above can be taken into account in the format of the constant δ (cm):

$$\delta = \frac{L}{16 \cdot \left(\frac{K'+1}{K'}\right)^2 \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2}.$$

In this case, the general equation is simplified to the following form:

$$\frac{\delta}{R_s} = A + \frac{B}{v} + C \cdot v,$$

which clearly explains the discovered dependence (see Figure 1, B). We did not find the last equation in previously published literature, but it may be of practical importance for future developers of analytical methods based on chromatography.

With increasing temperature, a linear decrease in R_s value was observed. Earlier, Jánovová & Hroboňová found a similar relationship between temperature and peak resolution in the chromatographic separation of lactic acid enantiomers [25], while Yadrova et al., on the contrary, found a direct relationship during the analysis of benzimidazoles [26]. Such a multidirectional effect can be explained by the influence of temperature on various factors, such as the solubility of the analyzed substance, the degree of its ionization and the distribution coefficient between the mobile and stationary phases, and the viscosity of the solvent [27], each of which can be decisive for a specific compound under the conditions of a particular chromatographic system.

The developed method of quantitative analysis based on HPLC was validated in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV for the characteristics "Specificity", "Accuracy", "Repeatability", "Analytical range", "Linearity", and "Limit of quantification", which allows us to recommend it for the needs of pharmaceutical analysis.

To assess the antioxidant capacity of the analyzed objects, one of the most common analytical approaches based on the model of inhibition of pre-generated $ABTS^{\bullet+}$ was chosen [28]. The *N* value of the analyzed objects varied from 6.20 to 6.42, i.e. each DHQ molecule inhibited more than 6 molecules of $ABTS^{\bullet+}$. Thus, all samples had a high antioxidant capacity: At a fairly low concentration of 1.9 μg/ml, they caused suppression of $ABTS^{\bullet+}$ by approximately 48 %, which is in good agreement with the results of tests on this model conducted earlier [29–30]. In similar experiments assessing diastereomers of silybin and dihydrosilybin these antioxidant properties differed insignificantly [31]. At the same time, theoretical calculations allow for the existence of discrepancy between diastereomers in the ability to scavenge free radicals [32]. In any case, there was no significant difference between the analyzed samples, and the sample size of the objects of study was too small for unambiguous statements.

The chemical process between DHQ and WST-8 is based on the reduction of the tetrazolium salt according to chemical reaction equation shown in Figure 3.

This chemical transformation is accompanied by a change of solution color. The pronounced reducing properties of DHQ have been repeatedly described previously using such models as FRAP, CUPRAC, and others [33–37]. Our results obtained using the WST-8 model confirm these data: All samples demonstrated a high *R* value at microgram concentrations. Differences in the *R* values of the analyzed objects were insignificant. In contrast to the $ABTS^{\bullet+}$ test, no correlation was found between the *cis*-diastereomer content and the reducing ability of the DHQ samples studied using the WST-8 model, which generally corresponded to our expectations. Nevertheless, the results of the current study indicate the need to take into account the reducing properties of DHQ when assessing its cytotoxicity using CCK-8.

It is also interesting to note that an inverse correlation was observed between the results of the $ABTS^{\bullet+}$ and WST-8 models. Inconsistency in the results of antioxidant properties assessment is widely presented in the literature [38–40]. Moreover, the results of assessment *in vitro* models may not coincide with *in vivo* experiments [41]. Therefore, the design of studies including several models seems to be a source of more relevant data for healthcare professionals. However, it can be concluded that the studied samples demonstrated high antioxidant activity, the value of which did not differ significantly in the studied range of *cis*-isomer of DHQ.

CONCLUSION

This study was conducted to investigate the antioxidant properties of DHQ samples with different diastereomeric compositions. A new analytical method based on HPLC characterized by good resolution between the peaks of *trans*- and *cis*-isomers was proposed for these purposes. The obtained results indicate the absence of a significant effect of the diastereomeric composition on the antioxidant properties of the studied DHQ samples. Thus, possible differences in the pharmacology

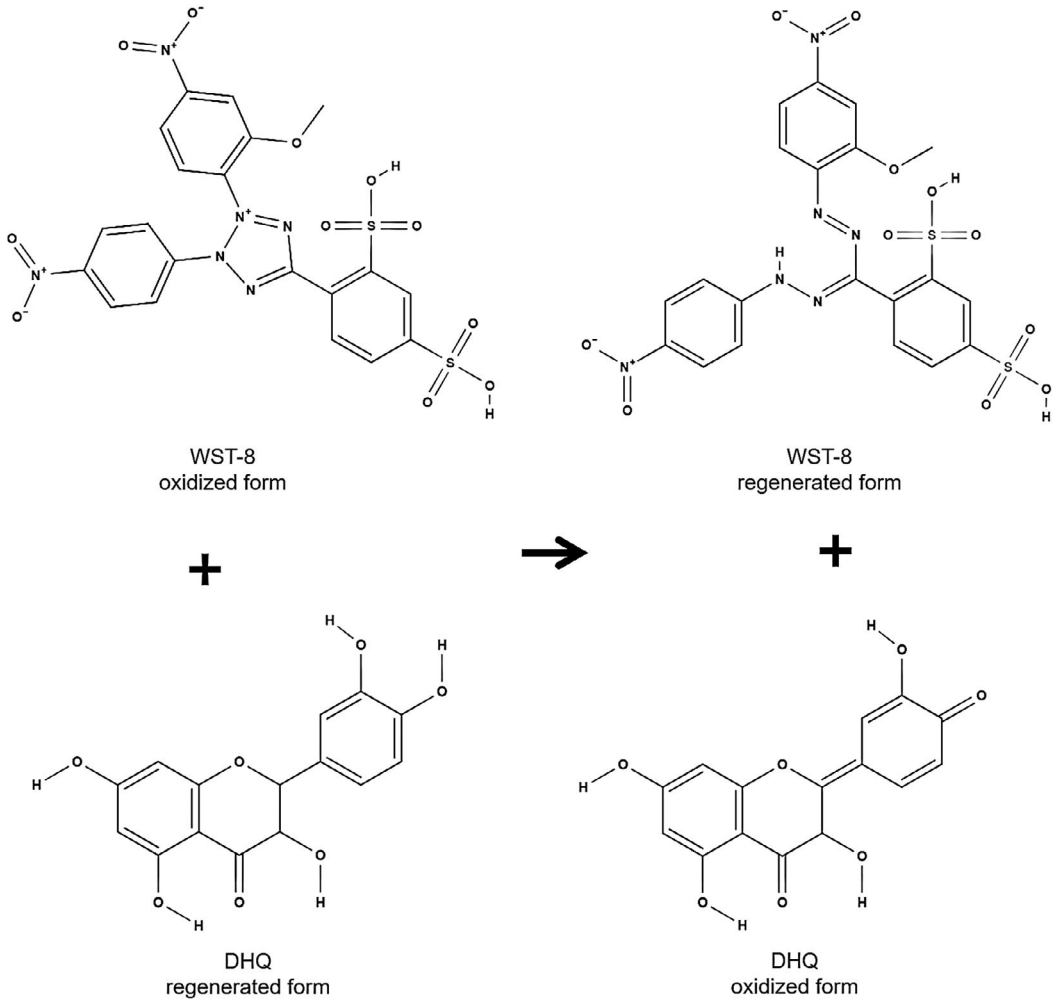


Figure 3. The chemical equation of the process between DHQ and WST-8 is based on the reduction of tetrazolium salt

of *cis*-isomer-enriched DHQ should be explained by the selectivity of interaction with biological targets, rather than the ability to scavenge free radicals. This hypothesis will need to be tested in future studies.

REFERENCES

1. Kazakova M. A., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Lyamin A. V., Kozlov A. V. Comparative microbiological and phytochemical study of extracts from leaves of varietal forms of the genus *Mentha* L. *Drug development & registration*. 2025;14(1):265–273. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1932.
2. Reshetov Ya. E., Ligacheva A. A., Trofimova E. S., Selivanova N. S., Krivoshchekov S. V., Basova E. V., Shersto-boev E. Yu., Avdeeva E. Yu., Kaminsky I. P., Danilets M. G., Belousov M. V. The component composition of the total flavonoid fractions from some *Ericaceae* family and their effect on the NO-stimulating activity of peritoneal macrophages. *Drug development & registration*. 2024;13(3):39–51. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-3-1813.
3. Luferov A. N., Bobkova N. V., Bokov D. O., Rodin M. N., Sergunova E. V., Kovaleva T. Yu., Rendyuk T. D., Strelyaeva A. V., Antsyshkina A. M., Prostodusheva T. V., Zaichikova S. G., Baeva V. M., Perova I. B., Eller K. I., Bessonov V. V. Identification and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in yellow wood anemone (*Anemone ranunculoides* L.) by UHPLC-DAD-HESI/MS analysis. *Drug development & registration*. 2024;13(2):106–117. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1505.
4. Das A., Baidya R., Chkraborty T., Samanta A. K., Roy S. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142;112004. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112004.
5. Okhlopkova Z. M., Ercisli S., Razgonova M. P., Ivanova N. S., Antonova E. E., Egorov Y. A., Kucharova E. V., Golokhvast K. S. Primary Determination of the Composition of Secondary Metabolites in the Wild and Introduced *Artemisia martjanovii* Krasch: Samples from Yakutia. *Horticulturae*. 2023;9(12):1329. DOI: 10.3390/horticulturae9121329.
6. Okhlopkova Z. M., Razgonova M. P., Rozhina Z. G., Egorova P. S., Golokhvast K. S. *Dracocephalum jacutense* Peschkova from Yakutia: Extraction and Mass Spectrometric Characterization of 128 Chemical Compounds. *Molecules*. 2023;28(11):4402. DOI: 10.3390/molecules28114402.
7. Zaytseva Y., Petruk A., Novikova T. Thidiazuron and LED Lighting Enhance Taxifolin and Rutin Production in *Rhododendron mucronulatum* Turcz. Microshoot Culture. *Jour-*

nal of Plant Growth Regulation. 2023;42:2933–2942. DOI: 10.1007/s00344-022-10757-4.
8. Li H., Zhang S., Dong Z., Shan X., Zhou J., Zeng W. *De Novo* Biosynthesis of Dihydroquercetin in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2024;72(35):19436–19446. DOI: 10.1021/acs.jafc.4c05546.
9. He Q., Yue M., Liu M., Ren X., Wang H., Chen J., Xiang J., He W., Ye S., Gao S., Xu S., Rao Y., Zhou J. *De novo* biosynthesis of dihydroquercetin in an engineered *Yarrowia lipolytica* with enhanced (2*S*)-eriodictyol. *Food Bioscience*. 2025;64:105912. DOI: 10.1016/j.fbio.2025.105912.
10. Terekhov R. P., Savina A. D., Pankov D. I., Korochkina M. D., Taldaev A., Yakubovich L. M., Zavadskiy S. P., Zhevlakova A. K., Selivanova I. A. Insights into the stereoisomerism of dihydroquercetin: analytical and pharmacological aspects. *Frontiers in Chemistry*. 2024;12:1439167. DOI: 10.3389/fchem.2024.1439167.
11. Vega-Villa K. R., Remsberg C. M., Ohgami Y., Yáñez J. A., Takemoto J. K., Andrews P. K., Davies N. M. Stereospecific high-performance liquid chromatography of taxifolin, applications in pharmacokinetics, and determination in tu fu ling (*Rhizoma smilacis glabrae*) and apple (*Malus × domestica*). *Biomedical Chromatography*. 2009;23(6):638–646. DOI: 10.1002/bmc.1165.
12. Vega-Villa K. R., Remsberg C. M., Takemoto J. K., Ohgami Y., Yáñez J. A., Andrews P. K., Davies N. M. Stereospecific pharmacokinetics of racemic homoeriodictyol, isosakuranetin, and taxifolin in rats and their disposition in fruit. *Chirality*. 2011;23(4):339–348. DOI: 10.1002/chir.20926.
13. Fischer A., Sellner M., Neranjan S., Smieško M., Lill M. A. Potential Inhibitors for Novel Coronavirus Protease Identified by Virtual Screening of 606 Million Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):3626. DOI: 10.3390/ijms21103626.
14. Oi N., Chen H., Kim M. O., Lubet R. A., Bode A. M., Dong Z. Taxifolin Suppresses UV-Induced Skin Carcinogenesis by Targeting EGFR and PI3K. *Cancer Prevention Research*. 2012;5(9):1103–1114. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0397.
15. Taldaev A., Terekhov R. P., Selivanova I. A., Pankov D. I., Anurova M. N., Markovina I. Y., Cong Z., Ma S., Dong Z., Yang F., Liao Y. Modification of Taxifolin Properties by Spray Drying. *Scientia Pharmaceutica*. 2022;90(4):67. DOI: 10.3390/scipharm90040067.
16. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26:1231–1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
17. Ilyasov I. R., Beloborodov V. L., Selivanova I. A. Three $ABTS^{\cdot+}$ Radical Cation-Based Approaches for the Evaluation of Antioxidant Activity: Fast- and Slow-Reacting Antioxidant Behavior. *Chemical Papers*. 2018;72:1917–1925. DOI: 10.1007/s11696-018-0415-9.
18. Iyasov I., Beloborodov V., Antonov D., Dubrovskaya A., Terekhov R., Zhevlakova A., Saydasheva A., Evteev V., Selivanova I. Flavonoids with Glutathione Antioxidant Synergy: Influence of Free Radicals Inflow. *Antioxidants*. 2020;9(8):695. DOI: 10.3390/antiox9080695.
19. Terekhov R. P., Taldaev A., Bocharov E. V., Pankov D. I., Savina A. D., Selivanova I. A. Analysis of *cis*-isomer-enriched dihydroquercetin sample by 1D and 2D NMR spectroscopy. *Drug development & registration*. 2024;13(2):68–76. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1751.
20. Terekhov R. P., Melnikov E. S., Nikitin I. D., Tokareva M. A., Rodina T. A., Savina A. D., Pankov D. I., Zhevlakova A. K., Beloborodov V. L., Selivanova I. A. Diastereomers of Spheroidal Form and Commercially Available Taxifolin Samples. *Scientia Pharmaceutica*. 2024;92(1):5. DOI: 10.3390/scipharm92010005.
21. Karpitskiy D. A., Bessonova E. A., Kartsova L. A., Tikhomirova L. I. Development of approach for flavonoid profiling of biotechnological raw materials *Iris sibirica* L. by HPLC with high-resolution tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2022;33(6):869–878. DOI: 10.1002/pca.3135.
22. Van Deemter J. J., Zuiderweg F. J., Klinkenberg A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*. 1956;5(6):271–289. DOI: 10.1016/0009-2509(56)80003-1.
23. González-López N. M., Insuasty-Cepeda D. S., Huertas-Ortiz K. A., Reyes-Calderón J. E., Martínez-Ramírez J. A., Fierro-Medina R., Rivera-Monroy Z. J., García-Castañeda J. E. Gradient Retention Factor Concept Applied to Method Development for Peptide Analysis by Means of RP-HPLC. *ACS Omega*. 2022;7(49):44817–44824. DOI: 10.1021/acsomega.2c04907.
24. Peristyy A., Nesterenko P. N., Das A., D'Alessandro D. M., Hilder E. F., Arrua R. D. Flow-dependent separation selectivity for organic molecules on metal–organic frameworks containing adsorbents. *Chemical Communications*. 2016;52:5301–5304. DOI: 10.1039/C6CC00111D
25. Jánovová L., Hroboňová K. Stationary phase type and temperature effect on HPLC separation of lactic acid enantiomers. *Acta Chimica Slovaca*. 2021;14(1):60–65. DOI: 10.2478/acs-2021-0008
26. Yadrova A. A., Grinevich O. I., Shafigulin R. V., Bulanova A. V. Influence of ionic liquids' nature on chromatographic retention of benzimidazoles by RP HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2020;44(3–4):127–139. DOI: 10.1080/10826076.2020.1858315
27. Heinisch S., Rocca J.-L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(4):642–258. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.11.079.
28. Ilyasov I. R., Beloborodov V. L., Selivanova I. A., Terekhov R. P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;*21*(3):1131. DOI: 10.3390/ijms21031131.
29. Park S.-M., He Y.-C., Gong C., Gao W., Bae Y.-S., Si C., Park K.-H., Choi S.-E. (2022) Effects of taxifolin from enzymatic hydrolysis of *Rhododendron mucrotulatum* on hair growth promotion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:995238. DOI: 10.3389/fbioe.2022.995238.
30. Zeouk I., Sifaoui I., Jalloul A. B., Bekhti K., Bazzocchi I. L., Piñero J. E., Jiménez I. A., Lorenzo-Morales J. Isolation, identification, and activity evaluation of antioxidant components from *Inula viscosa:* A bioguided approach. *Bioorganic Chemistry*. 2022;119:105551. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105551.
31. Dobiasová S., Řehořová K., Kučerová D., Biedermann D., Káňová K., Petrásková L., Koucká K., Václavíková R., Valentová K., Ruml T., Macek T., Křen V., Viktorová J. Multidrug Resistance Modulation Activity of Silybin Derivatives and Their Anti-Inflammatory Potential. *Antioxidants*. 2020;9(5):455. DOI: 10.3390/antiox9050455.

32. Heider E. M., Harper J. K., Grant D. M., Hoffman A., Dugan F., Tomer D. P., O'Neill K. L. Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivative: a proposed mechanism for citrinin. *Tetrahedron*. 2006;62(6):1199–1208. DOI: 10.1016/j.tet.2005.10.066.
33. Topal F., Nar M., Gocer H., Kalin P., Kocyigit U. M., Gülçin İ., Alwasel S. H. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015;*31*(4):674–683. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057723.
34. An H.-J., Yoon Y.-K., Lee J.-D., Jeong N.-H. Antioxidant and antimicrobial properties of dihydroquercetin esters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;58:e190800. DOI: 10.1590/s2175-97902022e190800.
35. Huynh T. T. H., Wongmaneepratip W., Vangnai K. Relationship between Flavonoid Chemical Structures and Their Antioxidant Capacity in Preventing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Formation in Heated Meat Model System. *Foods*. 2024;13(7):1002. DOI: 10.3390/foods13071002.
36. Das A., Ghosh B., Dasgupta S., Seal I., Sil S., Roy S. Inhibition of stemness and EMT by taxifolin ruthenium-p-cymene complex via downregulating the SOX2 and OCT4 expression on lung cancer. *Arabian Journal of Chemistry*. 2023;16(8):104995. DOI: 10.1016/j.arabjc.2023.104995.
37. Li X., Xie H., Jiang Q., Wei G., Lin L., Li C., Ou X., Yang L., Xie Y., Fu Z., Liu Y., Chen D. The mechanism of (+) taxifolin's protective antioxidant effect for •OH-treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2017;22:31. DOI: 10.1186/s11658-017-0066-9.
38. Vu D. T., Falch E., Elvevoll E. O., Jensen I.-J. Enzymatic Hydrolysis of Orange-Footed Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*)—Effect of Different Enzymes on Protein Yield and Bioactivity. *Foods*. 2023;12(19):3685. DOI: 10.3390/foods12193685.
39. Lebedev V. G., Lebedeva T. N., Vidyagina E. O., Sorokopudov V. N., Popova A. A., Shestibratov K. A. Relationship between Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Berries and Leaves of Raspberry Genotypes and Their Genotyping by SSR Markers. *Antioxidants*. 2022;11(10):1961. DOI: 10.3390/antiox11101961.
40. Baković M., Perković L., Matijević G., Martić A., Vujović T., Ekić S., Fumić M., Jurić S., Čož-Rakovac R., Roje M., Jokić S., Jerković I. Bioprospecting of Five *Ocimum* sp. Cultivars from Croatia: New Potential for Dietary and Dermatological Application with Embryotoxicity Tests. *Pharmaceuticals*. 2023;16(7):981. DOI: 10.3390/ph16070981.
41. Mota J. C., Almeida P. P., Freitas M. Q., Stockler-Pinto M. B., Guimarães J. T. Far from being a simple question: The complexity between *in vitro* and *in vivo* responses from nutrients and bioactive compounds with antioxidant potential. *Food Chemistry*. 2023;402:134351. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134351.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.012

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2218

Check for updates

CC BY 4.0

Применение подхода «качество через проектирование» (QbD) для разработки состава таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия

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

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

✉ **Контактное лицо:** Коцур Юлия Михайловна. **E-mail:** uliya.kocur@spcpu.ru

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

Статья поступила: 30.10.2025 **Статья принята в печать:** 03.12.2025 **Статья опубликована:** 05.12.2025

Резюме

Введение. Фармацевтическая разработка представляет собой сложнейшую комплексную работу, основной целью которой является достижение целевого профиля качества продукта (Quality Target Product Profile, QTPP). QTPP формулируется на основании целого комплекса требований к препарату, включая фармакопейные, потребительские, фармакологические и пр. Традиционный эмпирический подход к разработке состава и технологии лекарственной формы в данном случае представляется трудо- и ресурсоемким, при этом не позволяет в полной мере достичь понимания всех процессов как с точки зрения технологии, так и с точки зрения дальнейших этапов жизненного цикла лекарственного препарата (ЛП). Подход «качество через проектирование» (QbD) позволяет оценить влияние факторов на процессы, что, в свою очередь, способствует проактивному управлению рисками и созданию робастных технологий.

Цель. Продемонстрировать комплексное применение инструментов QbD, включая экспертные системы (Sediment Delivery Model, SeDeM), планирование экспериментов (Design of Experiment, DoE) и анализ рисков, на примере разработки состава таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

Материалы и методы. В работе использована оригинальная активная фармацевтическая субстанция (АФС) – 4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия, современные вспомогательные вещества и полимеры, обеспечивающие пролонгированное высвобождение (этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и пр.). На первом этапе для проектирования составов применялся метод SeDeM. На втором этапе для оптимизации профиля высвобождения использован скрининговый DoE.

Результаты и обсуждение. Метод SeDeM позволил количественно определить и нивелировать риски, связанные с неудовлетворительными технологическими свойствами АФС. Были спроектированы и экспериментально подтверждены составы с удовлетворительными технологическими свойствами. В результате DoE установлено, что ГПМЦ обеспечивает наиболее полное и равномерное высвобождение (более 80 % за 12 ч), приближенное к кинетике высвобождения нулевого порядка.

Заключение. Комплексное применение инструментов QbD позволило эффективно и обоснованно разработать робастный состав таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия, обеспечивающий как требуемые технологические свойства, так и требуемый профиль высвобождения.

Ключевые слова: QbD, Quality by Design, целевой профиль качества, дизайн эксперимента, пролонгированное высвобождение

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

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

Для цитирования: Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Наркевич И. А. Применение подхода «качество через проектирование» (QbD) для разработки состава таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):53–61. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2218

© Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., 2026
© Kotsur Yu. M., Flisyuk E. V., Narcevich I. A., 2026

Application of the quality by design (QbD) approach for the development of composition of extended-release tablets based on sodium 4,4′-(propanediamido)dibenzoate

Yulia M. Kotsur✉, **Elena V. Flisyuk, Igor A. Narcevich**

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

✉ **Corresponding author:** Yulia M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Yulia M. Kotsur – https://orcid.org/0000-0001-9292-4240;
Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462;
Igor A. Narcevich – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626.

Received: 30.10.2025 **Accepted:** 03.12.2025 **Published:** 05.12.2025

Abstract

Introduction. Pharmaceutical development is a complex work, the main goal of which is to achieve the quality target product profile (QTPP). QTPP is formulated on the basis of a whole set of requirements for the drug, including pharmacopoeial, consumer, pharmacological, etc. The traditional empirical approach to the development of the composition and technology of the dosage form in this case seems to be labor and resource-intensive, while it does not fully achieve an understanding of all processes both from the point of view of technology and from the point of view of further stages of the life cycle of the drug. The Quality by Design (QbD) approach allows you to assess the impact of factors on processes, which, in turn, contributes to proactive risk management and the creation of robust technologies.

Aim. Demonstrate the comprehensive use of QbD tools, including expert systems (Sediment Delivery Model, SeDeM), experimental planning (Design of Experiment, DoE) and risk analysis, using the example of the development of prolonged-release tablets based on sodium 4,4′-(propanediamido)dibenzoate.

Materials and methods. The paper uses the original active pharmaceutical ingredient (API) – sodium 4,4′-(propanediamido) dibenzoate, modern excipients and polymers that provide prolonged release (ethylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose, etc.). At the first stage, the SeDeM method was used to design the compositions. In the second step, screening DoE was used to optimize the release profile

Results and discussion. The SeDeM method made it possible to quantify and neutralize the risks associated with the unsatisfactory technological properties of the API. Compositions with satisfactory technological properties were designed and experimentally confirmed. As a result of DoE, it was found that HPMC provides the most complete and uniform release (more than 80% in 12 hours), close to zero-order release kinetics.

Conclusion. The comprehensive use of QbD tools made it possible to effectively and reasonably develop a robust composition of prolonged-release tablets based on sodium 4,4′-(propanediamido) dibenzoate, providing both the required technological properties and the required release profile.

Keywords: QbD, Quality by Design, target quality profile, experimental design, prolonged release

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

Contribution of the authors. Elena V. Flisyuk and Yulia M. Kotsur planned an experiment. Yulia M. Kotsur conducted the planned studies, all authors participated in data processing, discussion of the results and writing of the article.

For citation: Kotsur Yu. M., Flisyuk E. V., Narcevich I. A. Application of the quality by design (QbD) approach for the development of composition of extended-release tablets based on sodium 4,4′-(propanediamido)dibenzoate. *Drug development & registration*. 2026;15(1):53–61. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2218

ВВЕДЕНИЕ

Разработка современных лекарственных средств, особенно форм с модифицированным высвобождением, требует системного подхода, обеспечивающего не только эффективность и безопасность, но и робастность технологического процесса. Традиционный подход, основанный на методе «проб и ошибок», зачастую не позволяет выявить критические параметры и установить реальные границы спецификаций, что может приводить к вариабельности качества продукции [1–3].

Выходом из этой ситуации является внедрение подхода «качество через проектирование» (Quality by Design, QbD), инициированного руководством ICH Q8 (R2) [4–6]. Философия QbD заключается в

проактивном проектировании качества, основанном на глубоком научном понимании продукта и процесса, а не в реактивном контроле качества конечного продукта. Ключевыми элементами QbD являются определение целевого профиля качества продукта (Quality Target Product Profile, QTPP), выявление критически важных атрибутов качества (Critical Quality Attribute, CQA), проведение анализа рисков для определения критически важных параметров процесса (Critical Process Parameter, CPP), установление пространства проектирования и разработка контрольной стратегии [3–8].

Эффективная реализация QbD требует использования различных инструментов. В вопросах управления рисками, связанными с технологичностью порошковых смесей, высокую эффективность демонстрирует экспертная система SeDeM (Sediment Delivery Model), которая позволяет на этапе преформуляционных исследований количественно оценить пригодность материалов для прямого прессования и спроектировать состав [9–11]. Для оптимизации функциональных характеристик, таких как профиль высвобождения, незаменимым инструментом является планирование эксперимента (DoE) [12, 13].

Активная фармацевтическая субстанция 4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия (малобен), обладающая перспективной гепатопротекторной и антистеатозной активностью, была выбрана в качестве модели для разработки таблеток пролонгированного действия.

Цель исследования: применение подхода QbD с интеграцией методов SeDeM и DoE для разработки робастного состава и технологии таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась оригинальная АФС, 4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия, обладающая антистеатозным и гепатопротекторным действием.

В качестве материалов для замедленного высвобождения ЛВ применяли гидрофильные, гидрофобные (ацидорезистентные) и инертные полимеры: ГПМЦ торговой марки VivaPharm® HPMC (JRS Pharma, Германия); ЭЦ торговой марки BonuCel® (Biogrund GmbH, Германия), Kollicoat® MAE 100P – сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (BASF, Германия); Eudragit® L100-55 – сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (Evonik, Германия); Protanal® PH 6160 – натрия альгинат (DuPont, США). В качестве дополнительного компонента, обеспечивающего порообразование в полимерах и повышающего сыпучесть смеси, использовали лактозы моногидрат SuperTab® 30GR (DFE Pharma, Германия). В качестве лубриканта – магния стеарат фармакопейный (LekkoStyle, Россия). На момент исследования АФС и ВВ имели неистекшие сроки годности.

В качестве порообразующих компонентов использовали ПВП торговой марки VIVAPHARM® PVPP XL-10 (JRS Pharma, Германия) и МКЦ VIVAPHARM® HEWETEEN® 101 (JRS Pharma, Германия).

Технология получения таблеток. Для составов, спроектированных с помощью SeDeM, использовали технологию прямого прессования [9]. Для составов, предназначенных для изучения высвобождения, использовали технологию прямого прессования и влажного гранулирования с последующим прессованием таблеток массой 360 мг и диаметром 10 мм [10]. Контроль качества гранулятов и готовых таблеток (по показателям «прочность на раздавливание», «растворение», «внешний вид») проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XV изд. и Фармакопеи ЕАЭС.

Реализация QbD-подхода. Работа выполнялась в соответствии с этапами QbD-фреймворка.

Метод SeDeM. Проводили в соответствии с методикой, описанной J. Sune Negre и соавт. [8]. Оценивали 12 параметров АФС и ВВ: насыпную и уплотненную плотность, пористость, индекс Карра, число Хауснера, угол естественного откоса, сыпучесть, коэффициент прессуемости, потерю в массе при высушивании, гигроскопичность, долю частиц <50 мкм и индекс гомогенности. Полученные значения переводили в радиусы (от 0 до 10) и строили диаграммы. Рассчитывали параметрический индекс (IP) и параметрический индекс профиля (IPP). Проводили расчет требуемого количества корректирующего ВВ. Результаты приведены в предыдущих работах [9].

Изучение кинетики высвобождения. Испытание проводили на приборе «Растворение» DT620 (ERWEKA GmbH, Германия) с использованием корзинки (100 об/мин) в среде объемом 1000 мл, имитирующей ЖКТ (0,1М HCl в течение 2 ч, затем фосфатный буфер с pH 6,8 до 12 ч). Отбор проб проводили через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 ч. Количество высвободившегося вещества определяли УФ-спектрофотометрией при 268 нм [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отправной точкой для разработки любого лекарственного препарата с применением подхода QbD является составление целевого профиля качества продукта (QTPP). Основанием для составления такого профиля может являться коммерческая задача, предпочтения целевой аудитории продукта, фармакологические исследования, проведенные на этапе получения АФС, и т. д.

QTPP отражает конечные характеристики, которыми должен обладать конкретный лекарственный препарат. Для таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия QTPP приведен в таблице 1.

Пролонгированная форма 4,4′-(пропандиамидо) дибензоата натрия потенциально повышает приверженность лечению за счет снижения кратности при-

Таблица 1. Целевой профиль качества таблеток пролонгированного действия на основе 4,4'-(пропандиамидо)дибензоата натрия

Table 1. Quality target product profile of extended tablets based on sodium 4,4'-(propandiamido)dibezoate

Параметр QTPP QTPP element	Значение Target	Комментарии Comments
Лекарственная форма Dosage form	Таблетки с пролонгированным высвобождением Extended-release tablets	Обеспечивает необходимую биодоступность и комплаенс [11] Provides the necessary bioavailability and compliance [11]
Характеристики качества лекарственного препарата Drug product quality attributes	Выполнение фармакопейных требований к лекарственной форме Meeting pharmacopoeial requirements for the dosage form	Соответствуют физическим характеристикам (прочность, истираемость, описание), а также требованиям однородности массы, однородности дозирования, количественного определения They meet the physical characteristics (strength, abrasion resistance, description), as well as the requirements for uniformity of mass, uniformity of dosing, and quantitative determination
Дозировка Dose	180 мг 180 mg	Эквивалентна суточной дозировке [9, 10] Equivalent to the daily dosage [9, 10]
Срок годности Shelf life	3 года 3 years	Оптимальный срок годности для таблеток Optimal shelf life for tablets
Растворение Dissolution	Пролонгированное высвобождение в течение 12 ч 12-h extended-release	Равномерное высвобождение в течение дня минимизирует появление концентрационно зависимых побочных эффектов Uniform release throughout the day minimizes the occurrence of concentration-dependent side effects
Упаковка Container system	Обеспечивающая сохранность в нормальных условиях Ensuring safety under normal conditions	Согласно требованиям нормативной документации According to the requirements of the regulatory documentation

менения, а также обеспечивает более высокую биодоступность, так как ранее было установлено, что более высокой биофармацевтической растворимостью АФС обладает в слабощелочных средах [11].

На основании представленного профиля и с использованием доступных в различных источниках диаграмм Исикавы для таблеток был проведен анализ рисков, а именно определены характеры отказов и их последствия (Failure Mode and Effects Analysis, FMEA). Метод FMEA позволяет идентифицировать и определить приоритетность видов отказов, которые с наибольшей вероятностью могут привести к выходу значений для препарата за пределы спецификации [1].

Приоритетность рисков ранжируется по трем основным критериям: частоте возникновения (O), тяжести последствий (S) и возможности обнаружения (D). Каждый из этих признаков оценивался по шкале от 1 до 5 следующим образом: 5 – наивысшая оценка (часто возникающий отказ, наиболее серьезный отказ, трудно определимый отказ), 1 – низшая оценка (редко возникающий отказ, наименее серьезный, определим легко). Среди параметров, которые могут оказывать наибольшее влияние на характеристики профиля качества, были отобраны несколько, каждый из которых был оценен по указанным критериям. Риск отказа был рассчитан как номер приоритета риска (RPN) = O × S × D (таблица 2) [1, 7, 8].

Минимизация рисков, связанных с технологическими характеристиками таблеточных смесей и таблеток, была проведена путем определения и нивелирования неудовлетворительных технологических характеристик АФС. Для этого был использован описанный выше метод SeDeM. Составы разработанных таблеточных смесей приведены в таблице 3 [9].

На основании проведенного анализа были выбраны критические параметры качества (CQA) для дальнейшего скрининга, а именно: растворение через 2 ч, растворение через 6 ч, растворение через 12 ч, прочность на раздавливание. Оценивали влияние на данные показатели таких факторов, как тип и количество полимера, технология получения.

Результаты изучения технологических характеристик таблеточных смесей представлены в таблице 4.

По результатам проведенного исследования были определены те типы полимеров, которые позволили бы получить наиболее технологичные таблеточные смеси, а именно содержащие в качестве матрицеобразующего полимера ГПМЦ торговой марки VIVAPHARM® HPMC, ЭЦ BonuCel®. Сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата Kollicoat® MAE 100P, несмотря на удовлетворительные технологические свойства в смеси, не был выбран для дальнейшего исследования в силу высоких рисков с перебоями в поставках компонента.

Таблица 2. Анализ последствий отказа для оценки рисков

Table 2. Failure Mode and Effects Analysis for risk assessment

Критические параметры процесса Critical process parameters	Вид отказа Failure mode	Влияние отказа Failure effects	Возможные причины Potential causes	Методы отслеживания Control methods	Частота Occurence	Тяжесть Severity	Возможность обнаружения Detectability	Приоритет риска Risk priority number
Усилие прессования Compression force	Чрезмерное усилие Excessive force	Слишком медленное или слишком быстрое растворение Too slow or too fast dissolution	Высокая прочность таблетки High strength of the tablets	Испытание таблетки на прочность Тест «Растворение» Hardness test Dissolution test	2	5	3	30
Размер и форма частиц таблеточной смеси Particle shape and size	Слишком малый размер, шероховатая поверхность Too small size, rough surface	Нарушение однородности дозирования Violation of uniformity of dosage	Низкая сыпучесть смеси Low flowability of the mixture	Определение фракционного состава, Determination of fractional composition	3	5	2	30
Тип матрицеобразующего полимера Type of matrix-forming polymer	Неподходящий тип Unsuitable type	Слишком медленное или слишком быстрое растворение Too slow or too fast dissolution	Неподходящий тип, влияние других наполнителей Unsuitable type, the effect of other exipients	Тест «Растворение» Dissolution test	5	5	3	75
Количество матрицеобразующего полимера Ratio of matrix-forming polymer	Недостаточная или чрезмерная концентрация Insufficient or excessive concentration	Слишком медленное или слишком быстрое растворение Too slow or too fast dissolution	Недостаточная или чрезмерная концентрация Insufficient or excessive concentration	Тест «Растворение» Dissolution test	2	5	4	40

Таблица 3. **Составы таблеточных смесей**

Table 3. **Compositions of tablet mixtures**

Компонент, % Component, %	**Состав 1** Mixture 1	**Состав 2** Mixture 2	**Состав 3** Mixture 3	**Состав 4** Mixture 4	**Состав 5** Mixture 5	**Состав 6** Mixture 6
4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия Sodium 4,4′-(propandiamido)dibenzoate	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
VIVAPHARM® HPMC	27,78					
SuperTab® 30GR	21,22	13,00	24,00	1,78	2,90	1,00
BonuCel®		36,00				
Kollicoat® IR			25,00			
Kollicoat® MAE 100P				47,22		
Eudragit® L100-55					46,10	
Protanal® PH6160						48,00
Стеарат магния Magnesium Stearate	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Итого Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Таблица 4. **Технологические свойства таблеточных смесей**

Table 4. **Technological properties of tablet mixtures**

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

На следующем этапе необходимо было провести скрининговое исследование для определения количественного содержания матрицеобразующего полимера. Также дополнительно оценивалось влияние добавления порообразующих компонентов на скорость высвобождения АФС из таблеток (таблица 5). Для сокращения количества экспериментов и определения допустимого поля концентрации полимера основные матрицеобразующие компоненты были введены в двух массовых концентрациях – 27,7 % (наименьшая эффективная концентрация ГПМЦ), 35,0 % (средняя концентрация) и 40 % (предположительно, наибольшая эффективная концентрация).

Изучали прочность таблеток на раздавливание, а также кинетику высвобождения АФС из таблеток указанных составов в соответствии с изложенной методикой [11].

Проведено изучение влияния факторов – технологии, типа и количества полимеров (соответственно X1, X2 и X3) – на выбранные критические параметры качества при помощи полного регрессионного анализа ANOVA (Minitab 18). Результаты приведены в таблице 6. Коэффициенты уравнения регрессии для каждого фактора и комбинации факторов приведены в таблице 7.

Анализ полученных результатов показал, что основное влияние на прочность на раздавливание оказывает тип полимера и технология получения таблеток.

Начальная скорость высвобождения (через 2 ч) во многом определяется типом полимера: так, ГПМЦ дает более быстрое высвобождение в кислой среде. Также значимый эффект оказывают концентрация полимера и выбранный технологический режим.

Таблица 5. **Результаты скринингового исследования составов таблеток**

Table 5. **Results of the screening study of tablet formulations**

Партия	Полимер X1 Polymer X1	Концентрация X2, % Concentration X2, %	Технология X3 Technology X3	Твердость таблетки Y1, Н Hardness Y1, N	Растворение 2 ч Y2, % Dissolution 2h Y2, %	Растворение 6 ч Y3, % Dissolution 6 h Y3, %	Растворение 12 ч Y4, % Dissolution 12 h Y4, %
01	ГПМЦ HPMC	27,7	Прямое прессование Direct compression	44 ± 3	20,1 ± 1,3	65,4 ± 2,5	81,2 ± 1,9
02	ГПМЦ HPMC	35,0	Прямое прессование Direct compression	42 ± 2	20,0 ± 2,0	56,4 ± 0,4	80,5 ± 1,7
03	ГПМЦ HPMC	40,0	Прямое прессование Direct compression	46 ± 2	23,0 ±1,2	52,4 ± 1,8	79,4 ± 1,5
04	ГПМЦ HPMC	27,7	Влажное гранулирование Wet granulation	55 ± 4	27,1 ± 1,2	65,3 ± 3,6	86,9 ± 2,7
05	ГПМЦ HPMC	35,0	Влажное гранулирование Wet granulation	57 ± 6	25,2±1,2	55,0 ± 1,3	87,2 ± 1,2
06	ГПМЦ HPMC	40,0	Влажное гранулирование Wet granulation	56 ± 8	24,3 ± 2,1	57,2 ± 1,8	89,1 ± 1,6
07	ЭЦ EC	27,7	Прямое прессование Direct compression	51 ± 5	18,7 ± 3,3	55,5 ± 2,1	87,2 ± 1,6
08	ЭЦ EC	35,0	Прямое прессование Direct compression	54 ± 4	17,9 ± 1,8	52,3 ± 3,1	86,2 ± 1,3
09	ЭЦ EC	40,0	Прямое прессование Direct compression	59 ± 7	16,0 ± 2,5	52,1 ± 2,4	85,9 ± 1,8
10	ЭЦ EC	27,7	Влажное гранулирование Wet granulation	61 ± 2	15,5 ± 3,6	61,1 ± 1,5	82,1 ± 2,4
11	ЭЦ EC	35,0	Влажное гранулирование Wet granulation	59 ± 4	14,8 ± 2,2	60,9 ± 3,4	77,4 ± 1,9
12	ЭЦ EC	40,0	Влажное гранулирование Wet granulation	59 ± 6	13,2 ± 2,4	57,6 ± 2,2	72,8 ± 3,5

Таблица 6. **Результаты ANOVA**

Table 6. **The ANOVA results**

Отклик Response	SS	MS	DF	F	p-value	R^2	Adj R^2
Y_1	477,75	6,33	11	5,38	0,05	0,95	0,87
Y_2	229,42	3,98	11	1,51	0,27	0,93	0,83
Y_3	174,22	19,06	11	0,11	0,75	0,56	0,08
Y_4	307,82	17,89	11	11,21	0,03	0,77	0,51

Примечание. Расшифровка аббревиатур: SS – сумма квадратов; MS – среднее квадратичное значение; DF – число степеней свободы; F – значение коэффициента Фишера; R^2 – коэффициент детерминации; Adj R^2 – скорректированное значение R^2.

Note. Explanation of abbreviations: SS – sum of squares; MS – root mean square; DF – degrees of freedom; F – Fisher coefficient; R^2 – coefficient of determination; Adj R^2 – adjusted R^2.

Таблица 7. **Коэффициенты уравнения регрессии**

Table 7. **Regression equation coefficient**

Эффект Effect	Отклик Response			
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
X_1	0,68	1,25	–0,55	–0,84
X_2	4,95	–6,35	–1,10	–1,80
X_3	5,58	0,90	2,80	0,45
X_1X_2	0,15	–0,85	1,10	–1,50
X_1X_3	1,51	3,00	–1,50	0,90
X_2X_3	2,17	–1,80	0,40	5,10
$X_1X_2X_3$	1,97	0,90	0,30	–0,65

На 6-часовом интервале нет статистически значимых эффектов. Модель плохо объясняет вариабельность (низкое скорректированное значение R^2). Для объяснения такого эффекта требуется расширение дизайна эксперимента.

Мощный и значимый вклад дает совместное влияние типа полимера и технологии на высвобождение в конечной точке (12 ч). Таким образом, окончательное влияние на критический параметр – скорость высвобождения – оказывает сочетание конкретного полимера и технологии.

Установлено, что содержание ГПМЦ в диапазоне от 27,7 до 40 % позволяет эффективно высвобождать АФС из таблеток, при этом высвобождение на границах поля значений не имеет отличий, которые бы оказывали критическое влияние на качество получаемого препарата. В сочетании с технологией влажного гранулирования ГПМЦ в диапазоне концентраций от 27,7 до 40 % позволяет обеспечивать воспроизводимые результаты для теста «Растворение».

Увеличение количества ЭЦ, в свою очередь, снижает эффективность высвобождения, что требует дальнейшего изучения для определения пространства проектных значений для параметра концентрации.

В силу того, что ГПМЦ позволяет в достаточной степени высвобождать АФС в широком диапазоне значений, а также обеспечивает удовлетворительные технологические свойства как таблеточных смесей, так и таблеток, было принято решение выбрать данный полимер для применения в таблетках 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением. Использование такого полимера позволит снизить риски для качества получаемого продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы был продемонстрирован комплексный подход к разработке состава таблеток пролонгированного действия на основе 4,4′-(пропандиамидо) дибензоата натрия в рамках принципа QbD.

Метод SeDeM был эффективно применен для проактивного управления рисками, связанными с технологичностью порошковых смесей, и проектирования состава на ранней стадии.

Дальнейшее исследование кинетики высвобождения позволило оптимизировать состав для достижения целевого показателя – профиля высвобождения. Было изучено влияние факторов на критические показатели качества для таблеток пролонгированного действия, а именно: растворение через 2 ч, 6 ч и 12 ч, а также прочность на раздавливание. В результате проведенного исследования были предложены оптимальные составы таблеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lurian S., Turdean L., Tomuta I. Risk assessment and experimental design in the development of a prolonged release drug delivery system with paliperidone. *Drug Design, Development and Therapy.* 2017;11:733–746. DOI: 10.2147/DDDT.S125323.
2. Castillo Henríquez L., Vargas Zúñiga R., Carazo Berrocal G., Madrigal Redondo G., Calvo Guzmán B., Baltodano Viales E. Development of immediate release Rupatidine fumarate 10 mg tablets: A Quality by Design (QbD) approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 2019;45(10):1674–1681. DOI: 10.1080/03639045.2019.1652637.
3. Singh L., Sharma V. Implementation of Quality by Design Principles for the Evolution of optimized Sustained Release Drug Delivery System. *Drug Delivery Letters*. 2021;11:233–247. DOI: 10.2174/2210303111666210421121812.
4. Sousa A. S., Serra J., Estevens C., Costa R., Ribeiro A. J. A quality by design approach in oral extended release drug delivery systems: where we are and where we are going? *Journalof Pharmaceutical Investigation.* 2023;53:269–306. DOI: 10.1007/s40005-022-00603-w.
5. Son A.-W., Kim H. C., Kim D.-H., Ahn J.-Y., Park Y.-J., Kim J.-E. Quality-by-design applied development of tianeptine sodium sustained-release once-a-day dosing tablet. *Journal of Pharmceutical Investigation.* 2025;55:497–519. DOI: 10.1007/s40005-024-00707-5.
6. Chauhan B., Lata K., Agnihotri J., Kumar D. Formulation of Nanocrystal Loaded Racecadotril Immediate Release Tablets Using Quality by Design – QbD Approach. *Journal of Neonatal Surgery*. 2025;14(16S):668–679.
7. Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Андреева П. И., Флисюк Е. В., Дзюба А. С. Применение подхода Quality-by-Design для обоснования состава и технологии двухкомпонентных суппозиториев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):142–149. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-142-149.
8. Шмарова А. А., Пивоварова Н. С., Абросимова О. Н. Риск-ориентированный подход при получении и анализе свойств суспензионных культур клеток шлемника байкальского. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):47–56. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56.
9. Коцур Ю. М., Ладутько Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия с применением метода SeDeM. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–62. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
10. Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Сидоров К. О., Титович И. А., Наркевич И. А. Изучение влияния матрицеобразующих полимеров на скорость высвобождения 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия из таблеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):91–95. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1579.
11. Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю. Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4′-(пропандиамидо)дибензоата натрия с пролонгированным высвобождением. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154.
12. Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):45–48. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
13. Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):18–22. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.

REFERENCES

1. Lurian S., Turdean L., Tomuta I. Risk assessment and experimental design in the development of a prolonged release drug delivery system with paliperidone. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11:733–746. DOI: 10.2147/DDDT.S125323.
2. Castillo Henríquez L., Vargas Zúñiga R., Carazo Berrocal G., Madrigal Redondo G., Calvo Guzmán B., Baltodano Viales E. Development of immediate release Rupatidine fumarate 10 mg tablets: A Quality by Design (QbD) approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2019;45(10):1674–1681. DOI: 10.1080/03639045.2019.1652637.
3. Singh L., Sharma V. Implementation of Quality by Design Principles for the Evolution of optimized Sustained Release Drug Delivery System. *Drug Delivery Letters*. 2021;11:233–247. DOI: 10.2174/2210303111666210421121812.
4. Sousa A. S., Serra J., Estevens C., Costa R., Ribeiro A. J. A quality by design approach in oral extended release drug delivery systems: where we are and where we are going? *Journalof Pharmaceutical Investigation.* 2023;53:269–306. DOI: 10.1007/s40005-022-00603-w.
5. Son A.-W., Kim H. C., Kim D.-H., Ahn J.-Y., Park Y.-J., Kim J.-E. Quality-by-design applied development of tianeptine sodium sustained-release once-a-day dosing tablet. *Journal of Pharmceutical Investigation.* 2025;55:497–519. DOI: 10.1007/s40005-024-00707-5.
6. Chauhan B., Lata K., Agnihotri J., Kumar D. Formulation of Nanocrystal Loaded Racecadotril Immediate Release Tablets Using Quality by Design – QbD Approach. *Journal of Neonatal Surgery*. 2025;14(16S):668–679.
7. Smekhova I. E., Shigarova L. V., Andreeva P. I., Flisyuk E. V., Dzyuba A. S. Application of Quality-by-Design approach to justify the composition and technology of two-component suppositories. *Drug development & registration*. 2022;11(4):142–149. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-142-149.
8. Shmarova A. A., Pivovarova N. S., Abrosimova O. N. Risk-based approach in obtaining and analysing the characteristics of baikal skullcap suspension cultures. *Drug development & registration*. 2022;11(3):47–56. (In Russ.) DOI:10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56.
9. Kotsur J. M., Ladytko J. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Prediction of the composition of prolonged release tablets based on 4,4′-(propandiamido) sodium dibenzoate using the SeDeM method. *Drug development & registration*. 2021;10(4):54–62. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
10. Kotsur Yu. M., Flisyuk E. V., Sidorov K. O., Titovich I. A., Narkevich I. A. Study of the Effect of Matrix-forming Polymers on the Release Rate of Sodium 4,4′-(propanediamido)dibenzoate from Tablets. *Drug development & registration*. 2023;12(4):91–95. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1579.
11. Flisyuk E. V., Kotsur J. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu. Development of the "Dissolution" test method for tablets of sodium 4,4′-(propanediamido)dibenzoate with sustained release. *Drug development & registration*. 2021;10(4):146–154. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154.
12. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Drug development & registration*. 2019;8(3):45–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
13. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the Composition and Technology of New Neuroprotective Drug Tablets Using Fractional Factorial Design. *Drug development & registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.453

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2171

Check for updates

CC BY 4.0

Биофармацевтическая оценка систем контролируемой пероральной доставки индометацина на основе полимер-лекарственного и интерполиэлектролит-лекарственного комплексов

А. Ю. Ситенков[1], А. В. Ситенкова (Буховец)[1], Ш. Ф. Насибуллин[1], И. И. Сёмина[2], Р. И. Мустафин[1, 2]✉

[1] Институт фармации. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

[2] Центральная научно-исследовательская лаборатория. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России). 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Льва Толстого, д. 6/30

✉ **Контактное лицо:** Мустафин Руслан Ибрагимович. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: А. Ю. Ситенков – https://orcid.org/0000-0002-0192-4585;
А. В. Ситенкова (Буховец) – https://orcid.org/0000-0001-8179-4516;
Ш. Ф. Насибуллин – https://orcid.org/0000-0002-7255-8041;
И. И. Сёмина – https://orcid.org/0000-0003-3515-0845;
Р. И. Мустафин – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Статья поступила: 26.08.2025 **Статья принята в печать:** 11.12.2025 **Статья опубликована:** 12.12.2025

Резюме

Введение. Интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) – перспективные носители для систем с контролируемым высвобождением активных фармацевтических ингредиентов (АФИ). Введение АФИ ионного характера в системы доставки может приводить к образованию связей с полиэлектролитами, что оказывает влияние на высвобождение лекарственного вещества из лекарственной формы. Ранее были получены полимер-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO с индометацином, а также интерполиэлектролит-лекарственный комплекс, образованный сополимерами Eudragit® EPO, Eudragit® S100 и индометацином. Проведена оценка физико-химических свойств оптимальных образцов и показана перспективность их использования в системах контролируемой доставки индометацина.

Цель. Сравнительная биофармацевтическая оценка полимер-лекарственного и интерполиэлектролит-лекарственного комплексов как систем пероральной направленной доставки индометацина.

Материалы и методы. Полимер-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO и индометацина (ПЛК EPO/ИНД) и интерполиэлектролит-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO, Eudragit® S100 и индометацина (ИПЭЛК EPO/S100/ИНД) получены при молярном соотношении компонентов 3 : 1 и 4,5 : 1 : 1 соответственно. Оценку высвобождения индометацина из порошков и таблеток ПЛК и ИПЭЛК проводили методом II («Лопастная мешалка») с использованием тестера растворения DT 828 (ERWEKA GmbH, Германия). Концентрацию индометацина определяли УФ-спектрофотометрически на спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 270 нм. Математическое моделирование высвобождения индометацина осуществляли с использованием программы Microsoft Excel Office. Фармакокинетические исследования проводили на кроликах породы советская шиншилла. Исследуемые образцы вводили перорально, через определенные интервалы времени отбирали пробы крови из ушной вены. Концентрацию индометацина в плазме крови определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с УФ-детектированием. Основные фармакокинетические показатели рассчитывали с использованием программы Thermo Kinetica® (version 5.0, build 5.00.11; Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и обсуждение. Профили высвобождения индометацина из порошков ПЛК и ИПЭЛК характеризуются как «кишечный тип», где превалирующим механизмом является процесс релаксации полимерных цепей при высвобождении субстанции. Высвобождение индометацина из таблетированной матрицы на основе ИПЭЛК отличается от профиля высвобождения из порошка ИПЭЛК и достигает 19 %. Профиль высвобождения индометацина из таблеток ПЛК EPO/ИНД сходен с профилем высвобождения из порошка и достигает 58 %. На поверхности таблеток ИПЭЛК

© Ситенков А. Ю., Ситенкова (Буховец) А. В., Насибуллин Ш. Ф., Сёмина И. И., Мустафин Р. И., 2026
© Sitenkov A. Yu., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Nasibullin S. F., Semina I. I., Moustafine R. I., 2026

образуется гидрогелевый слой, который препятствует проникновению среды растворения внутрь матрицы. Высвобождение индометацина из образцов ИПЭЛК EPO/S100/ИНД происходит за счет диффузии лекарственного вещества из матрицы. ПЛК и ИПЭЛК в виде порошков обладают большим средним временем удерживания (MRT) по сравнению с таблетками ПЛК и ИПЭЛК. MRT ИПЭЛК и ПЛК в виде порошка превышает MRT субстанции индометацина в три и четыре раза соответственно. Максимальная концентрация индометацина в плазме крови кроликов при пероральном введении таблеток ИПЭЛК наблюдается через 8 часов эксперимента.

Заключение. Высвобождение индометацина из ПЛК EPO/ИНД происходит за счет наличия «дефектных» областей и релаксации полимерных цепей, это обеспечивает замедленный выход АФИ и невысокую относительную биодоступность, что позволяет использовать ПЛК в системах доставки индометацина для лечения воспалительных заболеваний толстого кишечника. Таблетированные системы ИПЭЛК EPO/S100/ИНД позволяют изменить профиль высвобождения индометацина за счет процессов диффузии субстанции через образующийся гидрогелевый слой на поверхности матрицы, обеспечивая высокую биодоступность, и могут быть использованы как матричные системы для доставки АФИ в оптимальную зону всасывания.

Ключевые слова: полимер-лекарственный комплекс, интерполиэлектролит-лекарственный комплекс, индометацин, фармакокинетическая оценка

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

Вклад авторов. А. Ю. Ситенков осуществлял получение образцов полимер-лекарственных и интерполиэлектролит-лекарственных комплексов, разработку методики хроматографического определения индометацина в плазме крови, проводил хроматографический анализ, расчет фармакокинетических параметров, интерпретировал результаты, участвовал в написании статьи. А. В. Ситенкова (Буховец) проводила работу с животными в рамках фармакокинетической оценки, пробоподготовку в рамках хроматографического анализа, участвовала в написании статьи. Ш. Ф. Насибуллин проводил работу с животными в рамках фармакокинетической оценки, пробоподготовку в рамках хроматографического анализа, участвовал в написании статьи. И. И. Семина осуществляла руководство и планирование экспериментов на животных. Р. И Мустафин проводил концептуализацию и определял методологию исследования, а также осуществлял корректировку статьи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263).

Для цитирования: Ситенков А. Ю., Ситенкова (Буховец) А. В., Насибуллин Ш. Ф., Сёмина И. И., Мустафин Р. И. Биофармацевтическая оценка систем контролируемой пероральной доставки индометацина на основе полимер-лекарственного и интерполиэлектролит-лекарственного комплексов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):62–72. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2171

Biopharmaceutical evaluation of oral controlled indomethacin delivery systems based on drug-polymer and drug-interpolyelectrolyte complexes

Alexander Yu. Sitenkov[1], Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets)[1], Shamil F. Nasibullin[1], Irina I. Semina[2], Rouslan I. Moustafine[1, 2]✉

[1] Institute of Pharmacy. Kazan State Medical University. 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia
[2] Central Research Laboratory. Kazan State Medical University (KSMU). 6/30, Lev Tolstoy str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420012, Russia

✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Alexander Yu. Sitenkov – https://orcid.org/0000-0002-0192-4585;
Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets) – https://orcid.org/0000-0001-8179-4516;
Shamil F. Nasibullin – https://orcid.org/0000-0002-7255-8041;
Irina I. Semina – https://orcid.org/0000-0003-3515-0845;
Rouslan I. Moustafine – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Received: 26.08.2025 **Accepted:** 11.12.2025 **Published:** 12.12.2025

Abstract

Introduction. Interpolyelectrolyte complexes (IPEC) are promising carriers for controlled drug delivery systems. The introduction of ionic API into delivery systems can lead to the formation of bonds with polyelectrolytes, which affects the release of the drug from the dosage form. Previously, a drug-polymer complex (DPC) based on Eudragit® EPO with indomethacin, as well as an drug-interpolyelectrolyte complex (DIPEC) with the participation of copolymers of Eudragit® EPO, Eudragit® S100 and indomethacin were obtained. The physicochemical properties of the optimal samples were assessed and the prospects for their use in controlled delivery systems of indomethacin were shown.

Aim. Comparative biopharmaceutical evaluation of drug-polymer and drug-interpolyelectrolyte complexes as oral controlled delivery systems for indomethacin.
Materials and methods. Drug-polymer complex based on Eudragit® EPO and indomethacin (DPC EPO/IND) and drug-interpolyelectrolyte complex based on Eudragit® EPO, Eudragit® S100 and indomethacin (DIPEC EPO/S100/IND) were obtained at the molar ratio of components of 3 : 1 and 4.5 : 1 : 1, respectively. The release of indomethacin from DPC and DIPEC powders and tablets was assessed by apparatus II "Rotating Paddle" using a DT 828 dissolution tester (ERWEKA GmbH, Germany). The concentration of indomethacin was determined by UV spectrophotometry on a Lambda 25 spectrophotometer (PerkinElmer, USA) at a wavelength of 270 nm. Mathematical modeling of indomethacin release was performed using Microsoft Excel Office. Pharmacokinetic studies were performed on Soviet Chinchilla rabbits. The studied samples were administered orally, blood samples were taken from the ear at certain intervals of time after administration. The concentration of indomethacin in blood plasma was determined by HPLC on an LC-20 Prominence chromatograph (Shimadzu, Japan) with UV-detection. The main pharmacokinetic parameters were calculated using the Thermo Kinetica® program (Version 5.0, Build 5.00.11; Thermo Fisher Scientific, USA).
Results and discussion. The release profiles of indomethacin from DPC and DIPEC powders are characterized as "intestinal type", where the predominant mechanism is the process of relaxation of polymer chains during the release of the substance. The release of indomethacin from the tablet matrix based on DIPEC differs from the release profile from DIPEC powder and reaches 19 %. The release profile of indomethacin from DPC EPO/IND tablets is similar to the release profile from the powder and reaches 58 %. A hydrogel layer is formed on the surface of DIPEC tablets, which prevents the penetration of the dissolution medium into the matrix. The release of indomethacin from DIPEC EPO/S100/IND samples occurs due to the diffusion of the drug from the matrix. DPC and DIPEC in powder form have a longer mean retention time (MRT) compared to DPC and DIPEC tablets. MRT of DIPEC and DPC in powder form exceeds MRT of indomethacin substance by three and four times, respectively. Maximum concentration of indomethacin in blood plasma of rabbits after oral administration of DIPEC tablets is observed after 8 hours of the experiment.
Conclusion. Indomethacin release from DPC EPO/IND occurs due to the presence of "defective" regions and relaxation of polymer chains, this ensures a slow release of the API and low relative bioavailability, which allows using DPC in indomethacin delivery systems for the treatment of inflammatory diseases of the colon. Tablet systems DIPEC EPO/S100/IND allow changing the release profile of indomethacin due to the diffusion processes of the substance through the formed hydrogel layer on the surface of the matrix, ensuring high bioavailability, can be used as matrix systems for delivering the API to the optimal absorption zone.

Keywords: drug polymer complex, drug interpolyelectrolyte complex, indomethacin, pharmacokinetic assessment

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

Contribution of the authors. Alexander Yu. Sitenkov carried out preparation of samples, developed a method for the chromatographic determination of indomethacin in blood plasma, carried out chromatographic analysis, calculated pharmacokinetic parameters, interpreted the results, participated in writing the article. Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets) carried out work with animals as part of pharmacokinetic assessment, sample preparation as part of chromatographic analysis, participated in writing the article. Shamil F. Nasibullin carried out work with animals as part of pharmacokinetic assessment, sample preparation as part of chromatographic analysis, participated in writing the article. Irina I. Semina supervised and planned animal experiments. Rouslan I. Mustafin carried out the conceptualization and methodology of the study, as well as proofreading the article.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project No. 23-15-00263).

For citation: Sitenkov A. Yu., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Nasibullin S. F., Semina I. I., Moustafine R. I. Biopharmaceutical evaluation of oral controlled indomethacin delivery systems based on drug-polymer and drug-interpolyelectrolyte complexes. *Drug development & registration*. 2026;15(1):62–72. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2171

ВВЕДЕНИЕ

Интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) являются перспективными носителями в пероральных системах с контролируемым высвобождением активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) [1–5]. ИПЭК могут быть использованы как носители в системах с контролируемой доставкой АФИ за счет особенностей структуры интерполиэлектролитной цепи. Научной группой Р. И. Мустафина были разработаны ИПЭК на основе сополимеров – производных акриловой и метакриловой кислот марки Eudragit® (Evonik, Ind., Германия). Учеными были получены носители для систем с контролируемым высвобождением АФИ в желудке и двенадцатиперстной кишке [6, 7], системы доставки в толстый кишечник [8, 9], а также

системы с пролонгированным высвобождением [10–13]. Известно, что введение АФИ ионного характера в системы доставки может приводить к образованию связей с полиэлектролитами, что оказывает влияние на высвобождение лекарственного вещества из лекарственной формы [14, 15]. Известны системы доставки гепарина и инсулина, основанные на взаимодействии их с полисахаридами, такими как хитозан и альгинат натрия [16]. В работах Palena et. al. исследовались комбинации Eudragit® L100 и Eudragit® E100 с такими фармацевтическими субстанциями, как атенолол, пропранолол, метоклопрамид, салициловая кислота, бензойная кислота, кетопрофен и напроксен, были показаны перспективные свойства наноразмерных систем доставки на основе данных комбинаций для перорального и местного применения [17, 18]. Также комбинация хитозана и карбоксиметилцеллюлозы с хлоргексидином была использована Bigucci et al. для разработки вагинальных систем доставки [19]. Amponsah-Efah et al. изучена возможность образования комплексов кетоконазола и карбамазепина с полиакриловой кислотой [20].

Научной группой Р. И. Мустафина были получены полимер-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO с индометацином, а также интерполиэлектролит-лекарственный комплекс с участием сополимеров Eudragit® EPO, Eudragit® S100 и индометацина, была проведена оценка физико-химических свойств оптимальных образцов, а также показана перспективность их использования в системах контролируемой доставки индометацина [21]. Для более детальной характеристики биофармацевтических свойств данных систем необходимо было провести математическое моделирование высвобождения индометацина, а также оценку фармакокинетических параметров в экспериментах *in vivo*.

Цель настоящей работы – биофармацевтическая оценка полимер-лекарственного и интерполиэлектролит-лекарственного комплексов в виде систем пероральной направленной доставки индометацина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полимер-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO (Evonik Ind., Германия) и индометацина (Sigma-Aldrich, Бельгия) состава 3:1 (ПЛК EPO/ИНД) и интерполиэлектролит-лекарственный комплекс на основе Eudragit® EPO, Eudragit® S100 (Evonik Ind., Германия) и индометацина (Sigma-Aldrich, Бельгия), полученный при молярном соотношении компонентов 4,5:1:1 (ИПЭЛК EPO/S100/ИНД), получали путем смешивания растворов полимеров и АФИ. Синтез образцов проводили в уксуснокислой среде при pH 7,2 и постоянном перемешивании на магнитной мешалке (RET control visc-white, IKA®-Werke GmbH, Германия) при 500 об/мин. Готовые образцы высушивали лиофильно в течение 2 дней (лиофильная сушилка FreeZone 1 L, Labconco®, США) [21].

Образцы таблеток были изготовлены методом прямого прессования на ручном гидравлическом прессе (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа. Диаметр таблеток для исследований *in vitro* составил 9 мм, а для *in vivo* – 6 мм. Форма таблеток двояковыпуклая, с радиусом кривизны 1,1D.

Для исследования высвобождения индометацина использовали тестер растворения DT 828 (ERWEKA GmbH, Германия) Условия теста: метод II «Лопастная мешалка», скорость вращения – 75 об/мин, температура среды – 37 ± 0,5 °C. Среда растворения – 0,1 М хлористоводородная кислота (1 час), фосфатные буферные растворы с pH 5,8; 6,8; 7,4 (по 2 ч в каждом) [22]. Общее время эксперимента – 7 ч для порошков и 10 ч для таблеток. Для определения концентрации индометацина использовали метод УФ-спектрофотометрии, прибор Lambda 25 (PerkinElmer, США), длина волны – 270 нм.

Математическое моделирование высвобождения индометацина осуществляли с использованием программы Microsoft Excel Office [23].

Фармакокинетическую оценку проводили на кроликах породы советская шиншилла. Условия содержания животных соответствовали международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и ГОСТ Р 50258-92. Эксперименты были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол заседания № 5 от 28.05.2012). Образцы вводили животным перорально в виде суспензии порошков, а также в виде таблеток, содержание индометацина в каждом образце составило 25 мг. Индометацин вводили в качестве контроля в виде таблеток субстанции. Отбирали пробы крови через определенные промежутки времени, далее центрифугировали в течение 4 мин при 1000 об/мин (MiniSpin, Eppendorf, Германия). Для осаждения белков использовали ацетонитрил (соотношение 1:1) с одновременным перемешиванием на шейкере (Multi Bio RS-24, Biosan, Латвия) в течение 4 мин. Супернатант отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин. Для определения концентрации АФИ использовали ВЭЖХ (LC-20 Prominence, Shimadzu, Япония). Условия анализа: хроматографическая колонка с привитой фазой С-18 (длина 150 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, зернение сорбента 5 мкм), температура – 40 °C, подвижная фаза – смесь 0,01 М ортофосфорной кислоты и ацетонитрила (30:70), режим – изократический, скорость подачи элюента – 1 мл/мин. Детекцию осуществляли на двухволновом УФ-детекторе при 280 нм и 318 нм. Время удерживания индометацина составляло 2 мин [24, 25]. Концентрацию индометацина рассчитывали используя метод абсолютной калибровки. Калибровочный график в изученном интервале концентраций представлял собой прямую линию (R^2 = 0,9970).

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программы Thermo Kinetica® (version 5.0, build 5.00.11; Thermo Fisher Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Профили высвобождения индометацина из порошков исследуемых образцов представлены на рисунке 1.

Согласно полученным данным, в средах, имитирующих верхние отделы ЖКТ, высвобождается не более 10 % индометацина, что говорит о том, что частицы ПЛК и ИПЭЛК являются кислотоустойчивыми и могут обеспечивать выход АФИ только в средах, имитирующих кишечник. Всего высвобождение активной фармацевтической субстанции достигает 50 % в случае ПЛК и 35 % для ИПЭЛК за 7 ч эксперимента. Ранее нами была показана роль структурных особенностей ПЛК и ИПЭЛК в высвобождении индометацина, а именно наличие так называемых «дефектных» областей [21]. Для более глубокого понимания механизма высвобождения был проведен подбор математической модели (таблица 1).

Согласно полученным данным, значения коэффициентов R^2 и MSC являются достаточно низкими ($R^2 < 0,95$), что затрудняет выбор наиболее подходящей модели для описания высвобождения индометацина. Наиболее высокие значения R^2 и MSC (Model Selection Criterion) для высвобождения из порошка ПЛК получены в случае моделей Korsmayer – Peppas и Peppas – Sahlin. Значение экспоненты высвобождения ($n = 1,338$) указывает на преобладание процессов релаксации полимерных цепей при высвобождении субстанции. В случае ИПЭЛК в качестве наиболее подходящей выбрана модель Makoid – Banakar.

Таблица 1. Значения коэффициентов R^2 и MSC высвобождения индометацина из порошков ПЛК и ИПЭЛК в соответствии с различными математическими моделями

Table 1. Values of coefficients R^2 and MSC of indomethacin release from DPC and DIPEC powders according to different mathematical models

Математическая модель Mathematical model	ПЛК ЕРО/ИНД DPC EPO/IND		ИПЭЛК ЕРО/S100/ИНД DIPEC EPO/S100/IND	
	R^2	MSC	R^2	MSC
Zero-order	0,9112	2,2786	0,8893	2,0580
First-order	0,8653	1,8621	0,8642	1,8536
Higuchi	0,6717	0,9710	0,6571	0,9274
Korsmayer – Peppas	0,9441	2,5993	0,9163	2,1952
Hixson – Crowell	0,8820	1,9939	0,8735	1,9249
Hopfenberg	0,9342	2,4358	0,9024	2,0414
Baker – Lonsdale	0,6415	0,8829	0,6369	0,8703
Makoid – Banakar	0,9321	2,2616	0,9507	2,5820
Peppas – Sahlin	0,9442	2,4570	0,9190	2,0851
Weibull	0,9499	2,5646	0,9260	2,1749
Gompertz	0,9380	2,4912	0,9372	2,4821

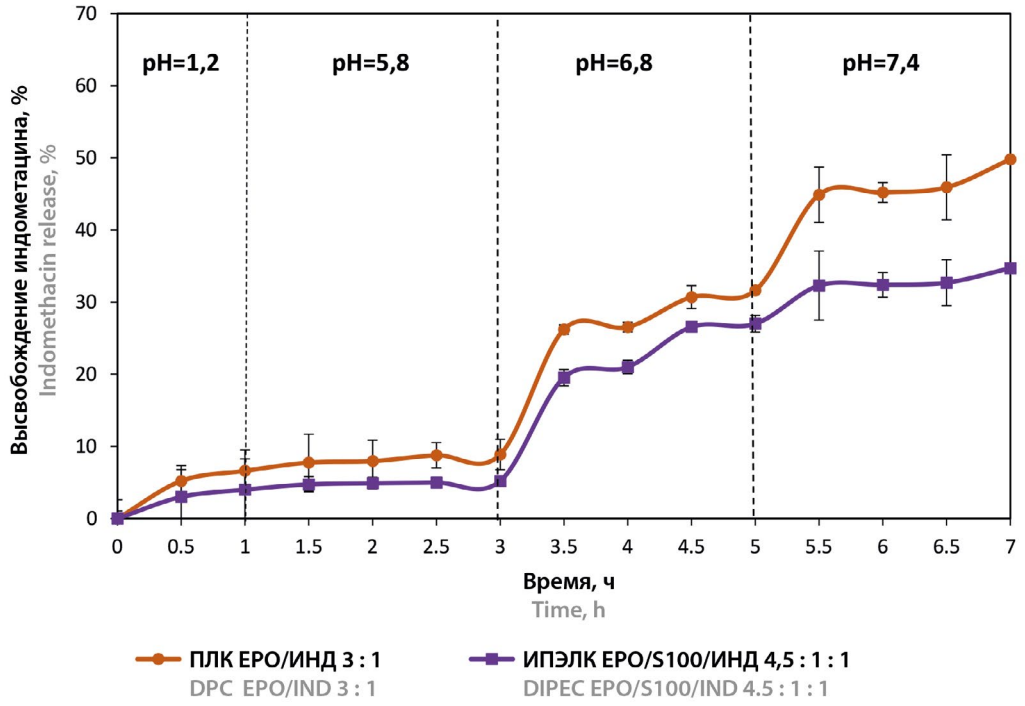


Рисунок 1. Профили высвобождения индометацина из порошков ПЛК и ИПЭЛК в средах, имитирующих среды ЖКТ ($n = 6$, среднее значение ±СО)

Figure 1. Release profiles of indomethacin from DPC and DIPEC powders in media simulating the gastrointestinal tract ($n = 6$, mean ±SD)

Для оценки перспективности использования ПЛК и ИПЭЛК в технологии таблетированных лекарственных форм проводилась оценка высвобождения индометацина из таблеток ПЛК и ИПЭЛК. На рисунке 2 показаны профили высвобождения индометацина из таблеток на основе исследуемых образцов.

В кислой среде, имитирующей pH желудка (1,2), высвобождение индометацина достигает 5 % из обоих таблетированных образцов. Однако далее при повышении pH среды растворения характер высвобождения индометацина из обоих исследуемых образцов начинает значительно отличаться. Так, в случае таблетированного ПЛК профиль высвобождения индометацина оказался сопоставимым с профилем высвобождения из порошка того же образца. Такое поведение матрицы обусловлено дезинтеграцией таблеток за 3 ч эксперимента с последующим высвобождением АФИ из образовавшихся частиц. При этом уровень высвобождения индометацина из матриц ИПЭЛК составляет около 20 % после 10 ч эксперимента, что, вероятно, связано с формированием гидрогелевого слоя на поверхности таблеток, который препятствует проникновению растворяющей среды внутрь матрицы (рисунок 3).

Возможной причиной образования гидрогелевого слоя на поверхности матриц ИПЭЛК является постепенное растворение в кислой среде избытка сополимера EPO с одновременным появлением на поверхности стехиометричного комплекса, образованного сополимерами S100 и EPO и нерастворимого в кислых средах, имитирующих pH желудка. При этом гидрогелевый слой делает матрицу более стабильной и менее проницаемой для индометацина.

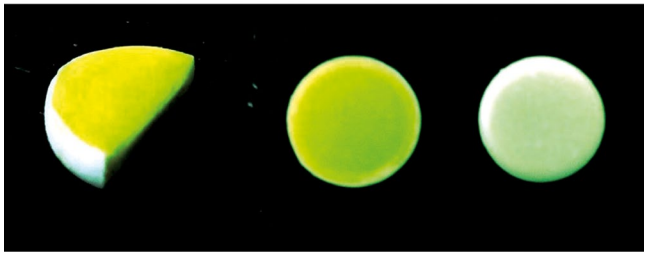


Рисунок 3. Фотография таблетки ИПЭЛК EPO/S100/ИНД в разрезе после оценки высвобождения (поверхность таблетки покрыта гидрогелевым слоем ИПЭК белого цвета, внутри – ИПЭЛК желтого цвета)

Figure 3. Photograph of a cross-section of the DIPEC EPO/S100/IND tablet after release assessment (the surface of the tablet is covered with a white IPEC hydrogel layer, and the DIPEC inside is yellow)

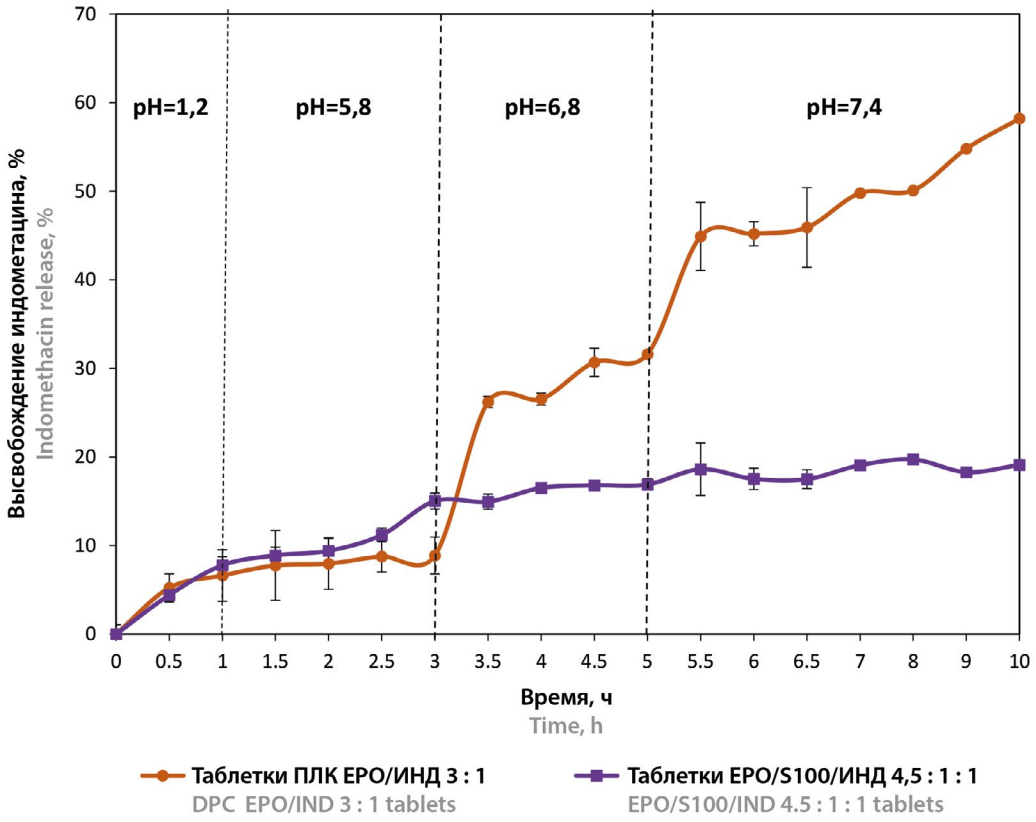


Рисунок 2. Профили высвобождения индометацина из таблеток ПЛК и ИПЭЛК в средах, имитирующих среды ЖКТ (*n* = 6, среднее значение ±CO)

Figure 2. Release profiles of indomethacin from DPC and DIPEC tablets in media simulating the gastrointestinal tract (*n* = 6, mean ±SD)

Для оценки механизма высвобождения индометацина из таблеток исследуемых образцов было проведено математическое моделирование (таблица 2).

Таблица 2. Значения коэффициентов R^2 и MSC высвобождения индометацина из таблеток ПЛК и ИПЭЛК в соответствии с различными математическими моделями

Table 2. Values of coefficients R^2 and MSC of indomethacin release from DPC and DIPEC tablets according to various mathematical models

Математическая модель Mathematical model	ПЛК EPO/ИНД DPC EPO/IND		ИПЭЛК EPO/S100/ИНД DIPEC EPO/S100/IND	
	R^2	MSC	R^2	MSC
Zero-order	0,9078	2,2662	–0,0232	–0,1406
First-order	0,9073	2,2604	0,1742	0,0738
Higuchi	0,7526	1,2792	0,8686	1,9122
Korsmayer – Peppas	0,9092	2,1641	0,9047	2,1150
Hixson – Crowell	0,9147	2,3442	0,1121	0,0012
Hopfenberg	0,9163	2,2452	0,1734	–0,0449
Baker – Lonsdale	0,7174	1,1460	0,8832	2,0299
Makoid – Banakar	0,9641	2,9735	0,9701	3,1558
Peppas – Sahlin	0,9182	2,1507	0,9700	3,1544
Weibull	0,9323	2,3393	0,9323	2,3394
Gompertz	0,9468	2,6986	0,9330	2,4677
Probit	0,9418	2,6080	0,9238	2,3386

Согласно полученным данным, для образцов ПЛК и ИПЭЛК наиболее подходящей, как и в случае порошка ИПЭЛК, является модель Makoid – Banakar. Однако данная модель является эмпирической и не имеет адекватного кинетического фундамента [26]. В случае образцов таблеток ИПЭЛК также может быть использована модель Peppas – Sahlin, которая учитывает взаимосвязанные эффекты диффузии по закону Фика и Case-II-транспорт [27, 28]. В таблице 3 приведены экспериментальные значения, полученные при использовании уравнения Peppas – Sahlin.

Таблица 3. Результаты математического моделирования высвобождения индометацина из таблеток ИПЭЛК EPO/S100/ИНД по уравнению Peppas – Sahlin

Table 3. Results of mathematical modeling of the release of indomethacin from DIPEC EPO/S100/IND tablets using the Peppas – Sahlin equation

Параметр Parameter	Значение Value
m	0,756
k_1	0,351
k_2	–0,002
R^2	0,9700

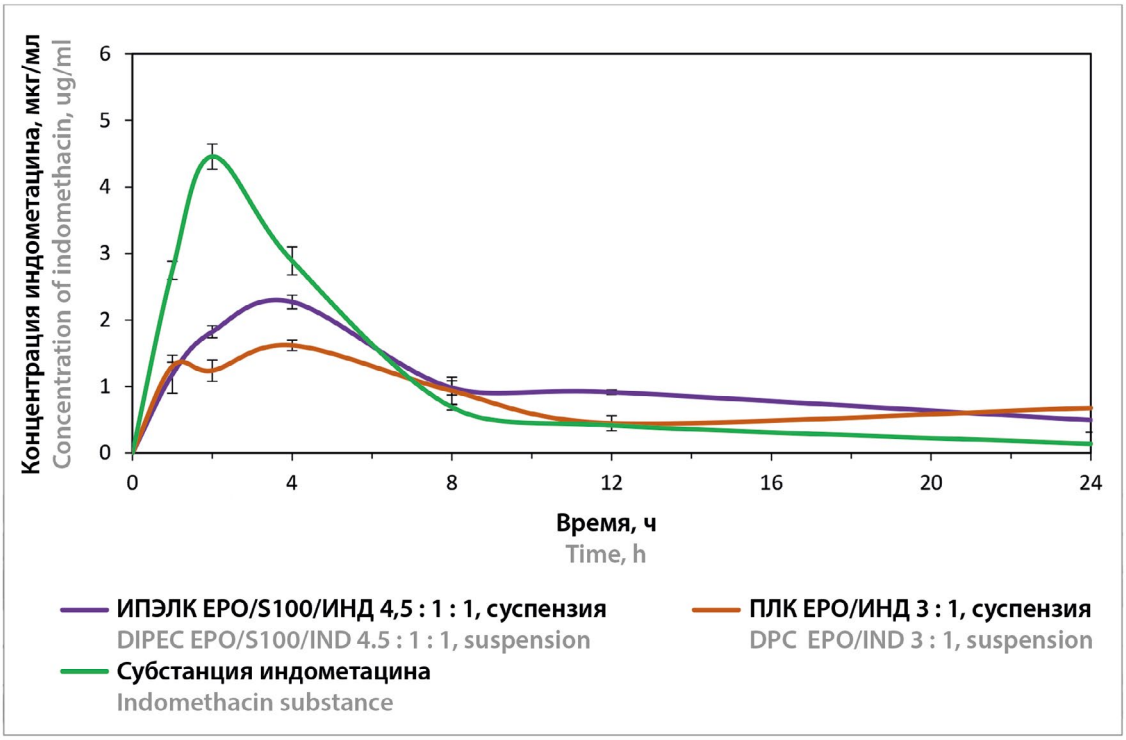


Рисунок 4. Фармакокинетические кривые индометацина в суспензии на основе ПЛК EPO/ИНД, ИПЭЛК EPO/S100/ИНД и субстанции индометацина в форме таблеток

Figure 4. Pharmacokinetic curves of indomethacin in suspension based on DPC EPO/IND, DIPEC EPO/S100/IND and indomethacin substance in tablet form

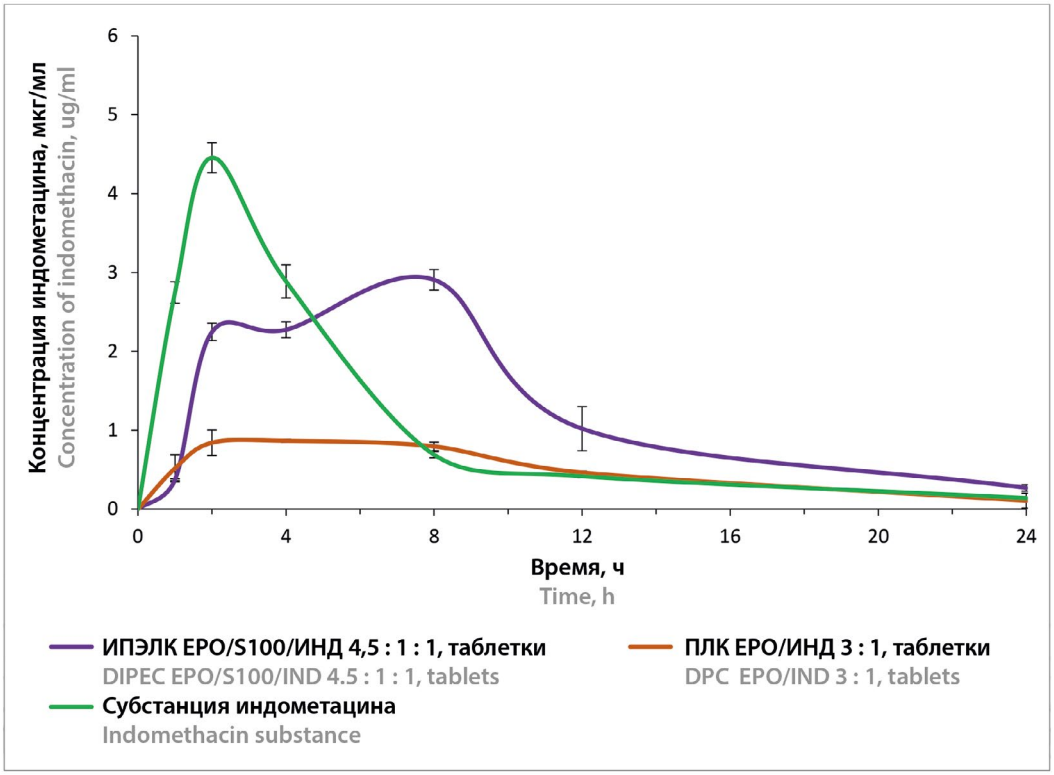


Рисунок 5. Фармакокинетические кривые индометацина в плазме крови кроликов после введения таблеток ПЛК EPO/ИНД, ИПЭЛК EPO/S100/ИНД и субстанции индометацина

Figure 5. Pharmacokinetic curves of indomethacin in rabbit blood plasma after administration of tablets of DPC EPO/IND, DIPEC EPO/S100/IND and indomethacin substance

Коэффициент R/F (Relaxation contribution / Fickian contribution) был рассчитан с использованием полученных экспериментальных данных, значение R/F < 1 для всех временных точек, что указывает на преобладание диффузионного компонента в процессе высвобождения индометацина из образцов ИПЭЛК EPO/S100/ИНД [29].

Для исследования поведения полученных систем в условиях *in vivo* были проведены фармакокинетические исследования на животных (кролики). Фармакокинетические кривые индометацина представлены на рисунках 4 и 5.

Фармакокинетические параметры представлены в таблице 4.

Таблица 4. Основные фармакокинетические параметры индометацина в ПЛК и ИПЭЛК в сравнении с субстанцией индометацина (программа Kinetica™ 5, модельно-независимый метод)

Table 4. Main pharmacokinetic parameters of DPC and DIPEC in comparison with indomethacin substance (Kinetica™ 5 program, model-independent method)

№ п/п No.	Образец Sample	C_{max}, мкг/мл C_{max}, ug/ml	T_{max}, ч T_{max}, h	$AUC_{0-24ч}$, мкг · ч/мл $AUC_{0-24ч}$, ug · h/ml	MRT, ч MRT, h	$F_{отн}$, % F_{rel}, %
1	ИПЭЛК (таблетки, 25 мг) DIPEC (tablets, 25 mg)	2,91 ± 0,13	8	33,46 ± 1,34	9,15 ± 0,39	142,50
2	ПЛК (таблетки, 25 мг) DPC (tablets, 25 mg)	0,87 ± 0,02	4	11,90 ± 0,46	9,89 ± 0,42	50,68
3	ИПЭЛК (порошок, 25 мг) DIPEC (powder, 25 mg)	2,27 ± 0,10	4	24,96 ± 1,08	20,58 ± 0,93	106,30
4	ПЛК (порошок, 25 мг) DPC (powder, 25 mg)	1,62 ± 0,08	4	19,44 ± 0,76	27,57 ± 1,14	82,79
5	Индометацин (порошок, 25 мг) Indomethacin (powder, 25 mg)	4,45 ± 0,19	2	23,48 ± 0,84	7,34 ± 0,32	–

Как видно, значение среднего времени удерживания для порошков ПЛК и ИПЭЛК превышает значения этого же параметра как для таблетированных образцов ПЛК и ИПЭЛК, так и для субстанции индометацина, введенной перорально. Также необходимо отметить, что при введении таблеток ИПЭЛК существенно увеличивается время T_{max} (8 ч). Относительная биодоступность АФИ в таблетках ИПЭЛК в полтора раза выше, чем из субстанции индометацина. Полученные результаты можно объяснить тем, что индометацин в составе ИПЭЛК находится в аморфном состоянии [21], что повышает его растворимость в сравнении с его кристаллической формой. В свою очередь, преобладание диффузионного компонента в механизме высвобождения индометацина из таблеток ИПЭЛК приводит к повышению его биодоступности из таблетированных систем в сравнении с порошками.

Таким образом, разработка пероральных лекарственных форм на основе ПЛК (суспензий и таблеток) является перспективной для создания препаратов, используемых при лечении воспалительных заболеваний толстого кишечника, благодаря замедленному высвобождению активного вещества и низкой биодоступности. В то же время лекарственные препараты на основе ИПЭЛК могут быть использованы для терапии системных заболеваний, учитывая высокие значения C_{max}, T_{max} и относительной биодоступности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, высвобождение индометацина из ПЛК ЕРО/ИНД происходит за счет наличия «дефектных» областей и релаксации полимерных цепей, это обеспечивает замедленный выход АФИ и невысокую относительную биодоступность, что позволяет использовать ПЛК в системах доставки индометацина для лечения воспалительных заболеваний толстого кишечника. В свою очередь, таблетированные системы ИПЭЛК ЕРО/S100/ИНД позволяют изменить профиль высвобождения индометацина за счет процессов диффузии субстанции через образующийся гидрогелевый слой на поверхности матрицы, обеспечивая высокую биодоступность, и могут быть использованы как матричные системы для доставки АФИ в оптимальную зону всасывания для лечения системных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moustafine R. I. Role of macromolecular interactions of pharmaceutically acceptable polymers in functioning oral drug delivery systems. *Russian Journal of General Chemistry*. 2014;84:364–367. DOI: 10.1134/S1070363214020388.
2. Khutoryanskiy V. V. Hydrogen-bonded interpolymer complexes as materials for pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;334:15–26. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.037.
3. Bourganis V., Karamanidou T., Kammona O., Kiparissides C. Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;111:44–60. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.11.005.
4. Lankalapalli S., Kolapalli V. R. M. Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;71:481–487. DOI: 10.4103/0250-474X.58165.
5. Izumrudov V. A., Mussabayeva B. Kh., Kassymova Zh. S., Klivenko A. N., Orazzhanova L. K. Interpolyelectrolyte complexes: advances and prospects of application. *Russian Chemical Reviews*. 2019;88(10):1046–1062. DOI: 10.1070/RCR4877.
6. Гордеева Д. С., Ситенкова (Буховец) А. В., Мустафин Р. И. Интерполиэлектролитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):72–76. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
7. Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. New Carriers for Bioadhesive Gastroretentive Drug Delivery Systems Based on Eudragit® EPO/Eudragit® L100 Interpolyelectrolyte Complexes. *Scientia Pharmaceutica*. 2024;92(1):14. DOI: 10.3390/scipharm92010014.
8. Bukhovets A. V., Fotaki N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer Complexes of Eudragit® Copolymers as Novel Carriers for Colon-Specific Drug Delivery. *Polymers*. 2020;12(7):1459. DOI: 10.3390/polym12071459.
9. Мустафин Р. И., Буховец А. В., Ситенков А. Ю., Гарипова В. Р., Кеменова В. А., Ромбаут П., Ван ден Моотер Г. Синтез и характеристика нового носителя на основе интерполиэлектролитного комплекса Eudragit® EPO/S100 для контролируемой доставки в область толстого кишечника. *Химико-фармацевтический журнал*. 2011;45(9):45–51. DOI: 10.30906/0023-1134-2011-45-9-45-51.
10. Moustafine R. I., Kabanova T. V., Kemenova V. A., den Mooter G. V. Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100. *Journal of Controlled Release*. 2005;103:191–198. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.11.031.
11. Moustafine R. I., Bodrov A. V., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Drug release modification by interpolymer interaction between countercharged types of Eudragit® RL 30D and FS 30D in double-layer films. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;439:17–21. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.044.
12. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Eudragit® E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit® L100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(7):2630–2641. DOI: 10.1021/mp4000635.
13. Moustafine R. I., Zaharov I. M., Kemenova V. A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragit® L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63:26–36. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.10.005.
14. Saboo S., Kestur U. S., Flaherty D. P., Taylor L. S. Congruent Release of Drug and Polymer from Amorphous Solid Dispersions: Insights into the Role of Drug-Polymer Hydrogen Bonding, Surface Crystallization, and Glass

Transition. *Molecular Pharmaceutics*. 2020;17(4):1261–1275. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01272.
15. De Robertis S., Bonferoni M. C., Elviri L., Sandri G., Caramella C., Bettini R. Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015;12(3):441–453. DOI: 10.1517/17425247.2015.966685.
16. Bianchera A., Bettini R. Polysaccharide nanoparticles for oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2020;17(10):1345–1359. DOI: 10.1080/17425247.2020.1789585.
17. Palena M. C., Manzo R. H., Jimenez-Kalruz A. F. Self-organized nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes as drug carries. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14:867–878. DOI: 10.1007/s11051-012-0867-8.
18. Palena M. C., García M. C., Manzo R. H., Jimenez-Kalruz A. F. Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;30:45–53. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.09.014.
19. Bigucci F., Angela A., Vitali B., Saladini B., Cerchiara T., Gallucci M. C., Luppi B. Vaginal inserts based on chitosan and carboxymethylcellulose complexes for local delivery of chlorhexidine: preparation, characterization and antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;478:456–463. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.008.
20. Amponsah-Efah K. K., Demeler B., Suryanarayanan R. Characterizing Drug-Polymer Interactions in Aqueous Solution with Analytical Ultracentrifugation. *Molecular Pharmaceutics*. 2021;18(1):246–256. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00849.
21. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Nasibullin Sh. F., Appeltans B., Kabanova T. V., Khutoryanskiy V. V., Van den Mooter G. Indomethacin-containing interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® EPO/S100 copolymers as a novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;524:121–133. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.053.
22. Lorenzo-Lamoza M. L., Remunán-Lopez R. C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998;52:109–118. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00203-4.
23. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Zhou A., Li W., Yao C., Xie S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*. 2010;3:263–271. DOI: 10.1208/s12248-010-9185-1.
24. Virginia B., Glass B., Nimmo A. High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Indomethacin in Porcine Plasma with Applicability to Human Levels. *Journal of Chromatographic Science*. 2006;44:41–44. DOI: 10.1093/chromsci/44.1.41.
25. Niopas I., Mamzoridi K. Determination of indomethacin and mefenamic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1994;656:447–450. DOI: 10.1016/0378-4347(94)00116-2.
26. Costa P., Sousa Lobo J. M. Evaluation of Mathematical Models Describing Drug Release from Estradiol Transdermal Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003;29(1):89–97. DOI: 10.1081/DDC-120016687.
27. Peppas N., Sahlin J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;57:169–172. DOI: 10.1016/0378-5173(89)90306-2.
28. Филиппова Н. И., Теслев А. А. Применение математического моделирования при оценке высвобождения лекарственных веществ *in vitro*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(4):218–226.
29. Unagollaa J. M., Jayasuriya A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;114:199–209. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.12.012.

REFERENCES

1. Moustafine R. I. Role of macromolecular interactions of pharmaceutically acceptable polymers in functioning oral drug delivery systems. *Russian Journal of General Chemistry*. 2014;84:364–367. DOI: 10.1134/S1070363214020388.
2. Khutoryanskiy V. V. Hydrogen-bonded interpolymer complexes as materials for pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;334:15–26. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.037.
3. Bourganis V., Karamanidou T., Kammona O., Kiparissides C. Polyelectrolyte complexes as prospective carriers for the oral delivery of protein therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;111:44–60. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.11.005.
4. Lankalapalli S., Kolapalli V. R. M. Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;71:481–487. DOI: 10.4103/0250-474X.58165.
5. Izumrudov V. A., Mussabayeva B. Kh., Kassymova Zh. S., Klivenko A. N., Orazzhanova L. K. Interpolyelectrolyte complexes: advances and prospects of application. *Russian Chemical Reviews*. 2019;88(10):1046–1062. DOI: 10.1070/RCR4877.
6. Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. Interpolyelectrolyte Complexes Based on Eudragit® Copolymers as Carriers for Bioadhesive Gastroretentive Metronidazole Delivery System. *Drug development & registration*. 2020;9(2):72–76. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
7. Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. New Carriers for Bioadhesive Gastroretentive Drug Delivery Systems Based on Eudragit® EPO/Eudragit® L100 Interpolyelectrolyte Complexes. *Scientia Pharmaceutica*. 2024;92(1):14. DOI: 10.3390/scipharm92010014.
8. Bukhovets A. V., Fotaki N., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer Complexes of Eudragit® Copolymers as Novel Carriers for Colon-Specific Drug Delivery. *Polymers*. 2020;12(7):1459. DOI: 10.3390/polym12071459.
9. Mustafin R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Yu., Garipova V. R., Kemenova V. A., Rombout P., Van den Mooter G. Synthesis and characterization of a new carrier based on the interpolyelectrolyte complex Eudragit® EPO/S100 for controlled delivery to the colon. *Chemical and pharmaceutical journal*. 2011;45(9):45–51. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2011-45-9-45-51.
10. Moustafine R. I., Kabanova T. V., Kemenova V. A., den Mooter G. V. Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100.

Journal of Controlled Release. 2005;103:191–198. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.11.031.
11. Moustafine R. I., Bodrov A. V., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Drug release modification by interpolymer interaction between countercharged types of Eudragit® RL 30D and FS 30D in double-layer films. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;439:17–21. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.044.
12. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Kemenova V. A., Rombaut P., Van den Mooter G. Eudragit® E PO as a complementary material for designing oral drug delivery systems with controlled release properties: comparative evaluation of new interpolyelectrolyte complexes with countercharged Eudragit® L100 copolymers. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(7):2630–2641. DOI: 10.1021/mp4000635.
13. Moustafine R. I., Zaharov I. M., Kemenova V. A. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragit® L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63:26–36. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.10.005.
14. Saboo S., Kestur U. S., Flaherty D. P., Taylor L. S. Congruent Release of Drug and Polymer from Amorphous Solid Dispersions: Insights into the Role of Drug-Polymer Hydrogen Bonding, Surface Crystallization, and Glass Transition. *Molecular Pharmaceutics*. 2020;17(4):1261–1275. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01272.
15. De Robertis S., Bonferoni M. C., Elviri L., Sandri G., Caramella C., Bettini R. Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015;12(3):441–453. DOI: 10.1517/17425247.2015.966685.
16. Bianchera A., Bettini R. Polysaccharide nanoparticles for oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2020;17(10):1345–1359. DOI: 10.1080/17425247.2020.1789585.
17. Palena M. C., Manzo R. H., Jimenez-Kalruz A. F. Self-organized nanoparticles based on drug-interpolyelectrolyte complexes as drug carries. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14:867–878. DOI: 10.1007/s11051-012-0867-8.
18. Palena M. C., García M. C., Manzo R. H., Jimenez-Kalruz A. F. Self-organized drug-interpolyelectrolyte nanocomplexes loaded with anionic drugs. Characterization and in vitro release evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2015;30:45–53. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.09.014.
19. Bigucci F., Angela A., Vitali B., Saladini B., Cerchiara T., Gallucci M. C., Luppi B. Vaginal inserts based on chitosan and carboxymethylcellulose complexes for local delivery of chlorhexidine: preparation, characterization and antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;478:456–463. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.008.
20. Amponsah-Efah K. K., Demeler B., Suryanarayanan R. Characterizing Drug-Polymer Interactions in Aqueous Solution with Analytical Ultracentrifugation. *Molecular Pharmaceutics*. 2021;18(1):246–256. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00849.
21. Moustafine R. I., Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Nasibullin Sh. F., Appeltans B., Kabanova T. V., Khutoryanskiy V. V., Van den Mooter G. Indomethacin-containing interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® EPO/S100 copolymers as a novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;524:121–133. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.053.
22. Lorenzo-Lamoza M. L., Remunán-Lopez R. C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998;52:109–118. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00203-4.
23. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Zhou A., Li W., Yao C., Xie S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*. 2010;3:263–271. DOI: 10.1208/s12248-010-9185-1.
24. Virginia B., Glass B., Nimmo A. High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Indomethacin in Porcine Plasma with Applicability to Human Levels. *Journal of Chromatographic Science*. 2006;44:41–44. DOI: 10.1093/chromsci/44.1.41.
25. Niopas I., Mamzoridi K. Determination of indomethacin and mefenamic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1994;656:447–450. DOI: 10.1016/0378-4347(94)00116-2.
26. Costa P., Sousa Lobo J. M. Evaluation of Mathematical Models Describing Drug Release from Estradiol Transdermal Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003;29(1):89–97. DOI: 10.1081/DDC-120016687.
27. Peppas N., Sahlin J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989;57:169–172. DOI: 10.1016/0378-5173(89)90306-2.
28. Filippova N. I., Teslev A. A. Application of mathematical modeling in the evaluation of *in vitro* drug release. *Drug development & registration*. 2017;(4):218–226. (In Russ.)
29. Unagollaa J. M., Jayasuriya A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;114:199–209. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.12.012.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.014

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2089

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка технологии получения гелей метронидазола с улучшенными биофармацевтическими свойствами на основе полимеров различной природы

М. С. Оленева✉, В. В. Грих, Т. И. Кунина, М. Ю. Войтко, А. Н. Воронин, К. А. Терских, М. И. Станцов, К. Г. Читанава, С. Р. Нарышкин, И. И. Краснюк (мл.)

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Оленева Мария Сергеевна. **E-mail:** mar-usy@yandex.ru

ORCID: М. С. Оленева – https://orcid.org/0000-0002-1620-699X;
В. В. Грих – https://orcid.org/0000-0003-1614-1070;
Т. И. Кунина – https://orcid.org/0009-0008-1472-732X;
М. Ю. Войтко – https://orcid.org/0009-0006-7650-2041;
А. Н. Воронин – https://orcid.org/0009-0000-2586-4700;
К. А. Терских – https://orcid.org/0000-0001-5781-3844;
М. И. Станцов – https://orcid.org/0000-0002-6686-8166;
К. Г. Читанава – https://orcid.org/0000-0001-6816-1319;
С. Р. Нарышкин – https://orcid.org/0000-0003-1775-4805;
И. И. Краснюк (мл.) – https://orcid.org/0000-0001-8557-8829.

Статья поступила: 29.04.2025 **Статья принята в печать:** 16.02.2026 **Статья опубликована:** 20.02.2026

Резюме

Введение. На базе Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет) изготовлены образцы мягкой лекарственной формы (МЛФ), а именно гели на основе полимеров-гелеобразователей различной природы, которые содержат твердую дисперсную систему (ТДС) метронидазола (МД). При разработке составов использовались следующие полимеры: карбопол-21, аммония метакрилата сополимер, гидроксиэтилцеллюлоза, гипромеллозы фталат, ксантановая камедь и альгинат натрия. Изучено влияние полимеров на высвобождение активной фармацевтической субстанции (АФС) из разработанных МЛФ. Изготовленные гели отличаются от промышленных аналогов, представленных на российском фармацевтическом рынке не только составами, но и улучшенными биофармацевтическими свойствами. Фармацевтическая доступность МД из разработанных образцов гелей не уступает доступности промышленных аналогов, а в отдельных случаях превышает ее. В перспективе это позволит уменьшить дозировку АФС и снизить степень проявления побочных эффектов на организм.

Цель. Разработать составы и технологические схемы получения гелей на основе твердых дисперсных систем метронидазола для наружного применения с использованием полимеров-гелеобразователей различной природы.

Материалы и методы. Субстанции: метронидазол, полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), карбопол Ультрез-21, аммония метакрилата сополимер, гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ), гипромеллозы фталат, ксантановая камедь, альгинат натрия, гидроксид натрия, натрия бензоат, вода очищенная. Получение гелей проводилось в несколько этапов: предварительное растворение и набухание гелеобразователя; добавление нейтрализующего агента к гелеобразователю (для карбопола Ультрез-21); приготовление ТДС – раствора МД в ПЭГ; добавление хелатирующего агента – ЭДТА; перемешивание массы до образования гомогенного геля. Полученные гели исследовали согласно ОФС.1.4.1.0008 «Мягкие лекарственные формы», ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия» Государственной фармакопеи РФ. Срок годности и условия хранения определяли согласно ОФС.1.1.0009.

Результаты и обсуждение. Получено 6 образцов гелей различного состава, содержащих исследуемую АФС МД. В каждом составе присутствовал полимер-гелеобразователь определенного происхождения (синтетический, полусинтетический или природный). Высвобождение АФС в диализную среду из разработанных лекарственных форм (ЛФ) не уступало данному параметру промышленных аналогов, а в отдельных случаях оказалось выше, чем у образцов сравнения промышленного производства. Экспериментально определены показатели стабильности и pH гелей.

© Оленева М. С., Грих В. В., Кунина Т. И., Войтко М. Ю., Воронин А. Н., Терских К. А., Станцов М. И., Читанава К. Г., Нарышкин С. Р., Краснюк И. И. (мл.), 2026
© Oleneva M. S., Grikh V. V., Kunina T. I., Voitko M. Yu., Voronin A. N., Terskikh K. A., Stantsov M. I., Chitanava K. G., Naryshkin S. R., Krasnyuk I. I. (Jr.), 2026

Заключение. Результатом исследования является получение составов и технологии изготовления МЛФ – гелей МД с улучшенными биофармацевтическими свойствами.

Ключевые слова: метронидазол, мягкая лекарственная форма, гель, гелеобразователь, полимер, высвобождение

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

Вклад авторов. М. С. Оленева, В. В. Грих, Т. И. Кунина и М. Ю. Войтко выполняли обзор литературных данных, планировали и осуществляли все этапы эксперимента, проводили анализ полученных данных и создавали текст статьи. А. Н. Воронин, К. А. Терских, М. И. Станцов выполняли комплексную оценку показателей качества разработанных мягких лекарственных форм. И. И. Краснюк (мл.), К. Г. Читанава проводили статистическую обработку экспериментальных данных. С. Р. Нарышкин осуществлял подготовку графического материала.

Для цитирования: Оленева М. С., Грих В. В., Кунина Т. И., Войтко М. Ю., Воронин А. Н., Терских К. А., Станцов М. И., Читанава К. Г., Нарышкин С. Р., Краснюк И. И. (мл.). Разработка технологии получения гелей метронидазола с улучшенными биофармацевтическими свойствами на основе полимеров различной природы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):73–83. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2089

Development of compositions and technology for obtaining metronidazole gels based on polymers of various nature

Maria S. Oleneva✉, Victoria V. Grikh, Tatiana I. Kunina, Maria Yu. Voitko, Andrey N. Voronin, Kirill A. Terskikh, Maxim I. Stantsov, Kristina G. Chitanava, Savva R. Naryshkin, Ivan I. Krasnyuk (Jr.)

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

✉ **Corresponding author:** Maria S. Oleneva. **E-mail:** mar-usy@yandex.ru

ORCID: Maria S. Oleneva – https://orcid.org/0000-0002-1620-699X;
Victoria V. Grikh – https://orcid.org/0000-0003-1614-1070;
Tatiana I. Kunina – https://orcid.org/0009-0008-1472-732X;
Maria Yu. Voitko – https://orcid.org/0009-0006-7650-2041;
Andrey N. Voronin – https://orcid.org/0009-0000-2586-4700;
Kirill A. Terskikh – https://orcid.org/0000-0001-5781-3844;
Maxim I. Stantsov – https://orcid.org/0000-0002-6686-8166;
Kristina G. Chitanava – https://orcid.org/0000-0001-6816-1319;
Savva R. Naryshkin – https://orcid.org/0000-0003-1775-4805;
Ivan I. Krasnyuk (Jr.) – https://orcid.org/0000-0001-8557-8829.

Received: 29.04.2025 **Accepted:** 16.02.2026 **Published:** 20.02.2026

Abstract

Introduction. Samples of a soft medicinal form (SMF) – specifically gels based on polymers of various natures serving as gelling agents – have been produced at the base of Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). These gels contain a solid disperse system (SDS) of metronidazole (MD). The following polymers were used in developing the formulations: carbopol-21, ammonium methacrylate copolymer, hydroxyethylcellulose, hypromellose phthalate, xanthan gum and sodium alginate. The effect of polymers on the release of the active pharmaceutical ingredient (API) from the developed SDFs has been studied. The produced gels differ from commercial analogs available on the Russian pharmaceutical market not only in their composition but also in their enhanced biopharmaceutical properties. The pharmaceutical availability of MD from the developed gel samples is not inferior to that of industrial analogues and, in some cases, even exceeds it.

Aim. To develop compositions and process flow charts for producing gels based on solid metronidazole dispersions for external use using various types of gelling agents.

Materials and methods. Substances: metronidazole, polyethyleneglycol-400 (PEG), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), carbopol ultrez 21, ammonium methacrylate copolymer, hydroxyethylcellulose (HEC), hypromellose phthalate, xanthan gum, sodium alginate, sodium hydroxide, sodium benzoate, purified water. The gels were produced in several stages: preliminary dissolution and swelling of the gelling agent; addition of a neutralizing agent to the gelling agent (for carbopol ultrez 21); preparation of a SDS solution of MD with PEG; the addition of a chelating agent – EDTA; mixing the mass until a homogeneous gel is formed. The obtained gels were investigated according to GPhM.1.4.1.0008 Ointments, GPhM.1.2.1.0004 Ionometry. Shelf life and storage conditions were determined according to GPhM.1.10009.15.

Results and discussions. Six samples of gels of different compositions containing the studied API were obtained. Each composition contained a gelling polymer of a certain origin (synthetic, semi-synthetic or natural). The release of the API into the dialysis medium from the developed dosage forms (DF) was not inferior to this parameter of industrial analogues, and in some cases it was higher than that of industrial comparison samples. The stability and pH of the gels were experimentally determined.

Conclusion. The research result is the development of compositions and manufacturing technology for SMF – metronidazole (MD) gels with improved biopharmaceutical properties.

Keywords: metronidazole, soft dosage form, gel, gelling agent, polymer, release

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

Contribution of the authors. Maria S. Oleneva, Victoria V. Grikh, Tatiana I. Kunina and Maria Yu. Voitko reviewed the literature, planned and implemented all stages of the experiment, analyzed the data obtained and wrote the text of the article. Andrey N. Voronin, Kirill A. Terskikh, and Maxim I. Stantsov performed a comprehensive assessment of the quality indicators of the developed soft dosage forms. Ivan I. Krasnyuk (Jr.), Kristina G. Chitanava performed statistical processing of the experimental data. Savva R. Naryshkin prepared the graphic material.

For citation: Oleneva M. S., Grikh V. V., Kunina T. I., Voitko M. Yu., Voronin A. N., Terskikh K. A., Stantsov M. I., Chitanava K. G., Naryshkin S. R., Krasnyuk I. I. (Jr.). Development of compositions and technology for obtaining metronidazole gels based on polymers of various nature. *Drug development & registration*. 2026;15(1):73–83. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2089

ВВЕДЕНИЕ

МД относится к производным имидазола и является синтетической химиотерапевтической субстанцией. Впервые МД разработала французская компания Rhône-Poulenc как средство против трихомониаза. В качестве антимикробного лекарственного средства МД активен как в отношении грамотрицательных бактерий, так и некоторых грамположительных [1, 13]. Уникальность МД заключается в сочетании сразу нескольких фармакологических эффектов – антибактериального, антипротозойного и противопаразитарного [5]. Благодаря вышеперечисленным свойствам МД получил признание врачей различных профилей – хирургов, терапевтов, гинекологов, стоматологов, дерматовенерологов и других специалистов в сфере здравоохранения [10].

Субстанция МД часто находит применение при изготовлении препаратов в рецептурно-производственном отделе аптечных организаций по индивидуальным прописям в различных ЛФ. МД является лекарственным средством социального значения и входит в список ЖНВЛП (раствор для инфузий; таблетки; таблетки, покрытые пленочной оболочкой)[1] [10].

По физическим свойствам МД – кристаллический порошок от белого до светло-желтого цвета. Температура плавления составляет от 159 до 163 °C. Наиболее востребованными ЛФ МД на фармацевтическом рынке являются МЛФ. На территории РФ зарегистрированы гели и кремы, содержащие МД [11]. Ключевым фактором, влияющим на фармацевтическую доступность МД из лекарственных препаратов (ЛП), является его малая растворимость в воде.

Для повышения растворимости и биодоступности МД является актуальным создание ТДС АФС с последующим применением в технологическом цикле разработки МЛФ полимеров различной химической природы, что позволит сохранить МД в тонкодисперсном состоянии, оптимизировать высвобождение АФС из ЛФ и снизить степень проявления побочных эффектов на организм за счет уменьшения дозы МД [3, 4, 6, 12, 14–19].

Таким образом, **целью данного исследования** является разработка составов и технологических схем получения гелей на основе твердых дисперсных систем метронидазола для наружного применения с использованием полимеров-гелеобразователей различной природы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанции и реактивы: метронидазол (Hubei Hongyuan Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Китай), полиэтиленгликоль-400 (Merck KGaA, Германия), этилендиаминтретрауксусная кислота (BASF, Германия), карбопол Ультрез-21 (Lubrizol, США), аммония метакрилата сополимер (ООО «Оргполимерсинтез», Россия), гидроксиэтилцеллюлоза (Ashland, США), гипромеллозы фталат (Kima Chemical Co., Ltd., Китай), ксантановая камедь (ООО «ДТК фарм», Россия), альгинат натрия (JRS Pharma, Индия), натрия гидроксид (ПАО «Химпром», Россия), натрия бензоат (АО «Татхимфармпрепараты», Россия), вода очищенная.

[1] Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 16.02.2023.

Приборы и аппаратура: весы аналитические (Aczet, Индия), магнитная мешалка «Таглер» ММ-135 Н (ООО «НПП Таглер», Россия), верхнеприводная мешалка (IKA, Германия), водяная баня LOIP LB-140 (АО «ЛОИП», Россия), гомогенизатор (IKA, Германия), иономер И-160 МИ (ООО «Измерительная техника», Россия), центрифуга лабораторная (Biosan, Латвия), климатическая камера HPP110eco (Memmert, Германия), спектрофотометр (UNICO, США), цифровой микроскоп (Levenhuk, Китай).

Методики

Качественная реакция для определения подлинности МД

Проводится с целью качественного определения МД в разработанных гелях. Подробная методика качественной реакции представлена в ГФ[1].

Исследование высвобождения метронидазола из разработанных гелей методом диализа через полупроницаемую мембрану (тест высвобождения in vitro)

Прибор для диализа состоит из наружного стеклянного стакана, содержащего диализную среду, внутреннюю диализную трубку, с зафиксированной на нижнем отверстии диализной пленкой (размер пор 12–14 кДа) [13]. На аналитических весах отвешивали навеску испытуемого образца геля массой 2,000 г и наносили на полупроницаемую мембрану – диализную пленку, равномерно распределяя слой геля по всей площади мембраны в трубке с помощью стеклянной палочки. Исследуемый образец, находящийся на диализной пленке, помещали в диализную среду на глубину 5 мм. Универсальный буферный раствор объемом 30 мл и pH 5,5–5,8 выступал в качестве диализной среды. Температура опыта составляла 36,5 ± 1 °С. Пробы из диализата отбирали каждые 60 мин (в течение 6 ч), $n = 5$. Взятые порции диализата (5 мл) фильтровали с помощью шприцевых насадок (Minisart, размер пор – 0,45 мкм, материал – нейлон) [9]. Отобранный объем проб компенсировали добавлением очищенной воды, что обеспечивало дальнейшее растворение вещества за счет диффузионного механизма. В результате количество вещества оставалось неизменным при внесении новой порции очищенной воды. Фильтрованную пробу помещали в кювету (размер – 1 см; материал – кварц) и проводили УФ-спектрофотометрию. Длины волн УФ-спектров диализатов изучаемых гелей соответствовали максимуму поглощения МД – 277 ± 2 нм (по ГФ XV, ФС.2.1.0136 «Метронидазол», спектр поглощения испытуемого раствора в области длин волн от 230 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 277 нм и минимум поглощения при длине волны 240 нм) [7]. В качестве препаратов сравнения использовали гели промышленных ЛП, доступных к свободной продаже на российском фармацевтическом рынке: препарат сравнения А – «Дентамет» (АО «Алтайвитамины», Россия); препарат сравнения В – «Метронидазол 3Д» (ЗАО «Зеленая Дубрава», Россия); препарат сравнения С – «Метрогил» для наружного применения (Unique Pharmaceutical Laboratories, Индия).

Определение степени высвобождения (*R*) МД основано на законе светопоглощения Бугера – Ламберта – Бера, определение *R* в процентах из разработанных МЛФ проводили по формуле (1):

$$R = \frac{C_0}{D_0} \cdot Dx \frac{V \cdot 100\ \%}{m}, \qquad (1)$$

где *R* – количество высвободившегося МД из гелей, %; C_0 – концентрация МД в стандартном образце (СО), моль/л; D_0 – оптическая плотность СО; *Dx* – оптическая плотность исследуемого образца; *V* – объем диализной среды, мл; *m* – масса МД в образце геля для диализа, г.

Исследование размера частиц полученной твердой дисперсии метронидазола + ПЭГ в разработанных гелях методом динамического рассеяния света

Для определения принадлежности полученной ТД (МД + ПЭГ) к коллоидным системам по принципу размера частиц использовали определение размера частиц методом динамического рассеяния света (ГФ XV, проект статьи ОФС «Определение размера частиц методом динамического рассеяния света») на приборе Nanolink SZ 902M (Китай), программное обеспечение Nanolink 2.20.7. (диапазон анализа размеров частиц: 0,3 нм – 15 мкм), источник света – твердотельный термостабилизируемый лазер 638 нм. Для этого в кювету из полистирола объемом 3,5 мл (ширина – 10 мм) помещали образец дисперсии ПЭГ-400 : метронидазол при разведении 1 : 100 водой очищенной, что соответствовало корректному значению индекса полидисперсности (PI), равному 0,31. Угол падения лазера на кювету составил 173°. Измерение проводили 5 раз при температуре 25 °С и определяли средний размер частиц.

Исследование микрокристаллоскопии

Микрокристаллоскопический анализ субстанции МД проводили с помощью микроскопа Levenhuk D50L NG при четырехкратном увеличении. Навеску МД массой 0,1 наносили на предметное стекло и исследовали в капле вазелинового масла под покровным стеклом. Аналогичным образом отдельно на предметных стеклах изучали структуру разработанных гелей.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/?ysclid=me73b3229g252848745 Ссылка активна на 16.02.2023.

Изучение стабильности разработанных МЛФ при хранении

Исследование проводили в соответствии с ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств»[1]. Образцы хранили в климатической камере марки HPP110eco (Memmert, Германия). В течение всего срока проведения эксперимента в камере поддерживалась заданная температура 40 ± 2 °C. Полученные образцы гелей помещали в алюминиевые тубы с завинчивающейся крышкой, изготовленной из полипропилена, далее все образцы располагали в камере для последующего хранения. Ускоренное хранение проводили на трех сериях для каждого состава при температуре 40 ± 2 °C и относительной влажности 75 ± 5 %. Испытание длилось в течение 6 месяцев. Оценивали качество свежеприготовленных гелей, а также через 3 и 6 месяцев ускоренного хранения.

Агрегативная устойчивость

Измеряли агрегативную устойчивость свежеполученных гелей, а также через 3 и 6 месяцев ускоренного хранения путем их центрифугирования. Для этого отмеривали 5 мл образца в пробирку для центрифугирования (Greiner Bio-one, 10 мл), помещали в центрифугу (LMC-3000 Biosan). В течение 5 мин проводили центрифугирование при скорости 6000 об/мин. Образцы, сохранившие свою агрегативную устойчивость после 5 мин центрифугирования, отмечались как стабильные.

Кк – коэффициент кинетической стабильности (ККС) – описывает способность ЛФ к выделению водной фазы или других жидких составляющих. Для расчета ККС используют формулу (2).

$$Кк = H1/H2, \quad (2)$$

где Кк – коэффициент кинетической стабильности (ККС); H1 – слой отделившейся фазы (высота), мм; H2 – слой геля (высота), мм.

Определение pH фильтрата

Измерение pH извлечения из изучаемых и промышленных гелей проводили по ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия». К точной навеске исследуемого образца (2,000 г) добавляли 50 мл очищенной воды, затем в течение 30 мин проводили перемешивание на верхнеприводной мешалке со скоростью 7500–8000 об/мин при температуре (36,5 ± 1 °C. Полученный раствор фильтровали с помощью бумажного фильтра (ТУ 2642-001-68085491-2011, фильтр бумажный «синяя лента»). Измерение pH проводили методом потенциометрии с использованием лабораторного pH-метра И-160 МИ («Измерительная техника», Россия). Для калибровки прибора использовали стандартные буферные растворы (ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия»). Температура во время измерения составляла 23 ± 2 °C. Комбинированный электрод помещали в фильтрат, измеряли pH, затем также измеряли pH фильтратов через 3 и 6 мес. после ускоренного старения.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/?ysclid=me73e8h266822507633. Ссылка активна на 11.11.2023.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав и технология изготовления гелей

Изготовлены 6 образцов геля с ТДС МД по 50 г различного состава. В качестве полимеров-гелеобразователей использовались разрешенные в соответствии с Перечнем вспомогательных веществ, используемых при производстве лекарственных средств ЕАЭС, синтетические полимеры – карбопол-21 и аммония метакрилата сополимер, полусинтетические полимеры – ГЭЦ и гипромеллозы фталат, а также природные полимеры – ксантановая камедь и альгинат натрия. Выбор данных полимеров основан на их экономичности и безопасности, а также распространенности на фармацевтическом рынке. Выбранная концентрация МД (1 %) соответствует концентрации в промышленных ЛП, представленных на российском фармацевтическом рынке. Особенность технологии получения всех образцов гелей заключается в предварительном изготовлении коллоидного раствора ТДС путем внесения МД в ПЭГ и последующем введении ТДС в матрицу полимера-гелеобразователя. Данный технологический прием позволяет сохранять коллоидный размер частиц АФС МД в структуре ПЭГ и в матрице полимера-гелеобразователя, а также препятствует сближению частиц МД в геле, образованию крупных агрегатов МД с последующей потерей агрегативной и седиментационной устойчивости полученной МЛФ. Составы разработанных гелей представлены в таблице 1.

Технология получения ТДС с МД для всех разработанных образцов гелей, а также уже готовых МЛФ имеет сходные стадии. Основное отличие заключается в выборе вида используемого полимера-гелеобразователя. При получении геля на основе ограниченно набухающего карбопола-21 дополнительной является стадия нейтрализации полимера путем введения в раствор натрия гидроксида (концентрация раствора NaOH – 50 %).

Результаты определения размера частиц твердой дисперсии

Измерение частиц ТДС МД+ПЭГ проводили методом динамического рассеяния света. По результатам исследования средний размер частиц МД в ПЭГ равен 12 нм, что свойственно коллоидным системам [8]. Таким образом, полученная ТДС является коллоидным раствором.

Таблица 1. Разработанные составы гелей с метронидазолом (50 г)

Table 1. Developed gels with metronidazole (50 g)

Ингредиент Ingredient	Образец 1 Sample 1	Образец 2 Sample 2	Образец 3 Sample 3	Образец 4 Sample 4	Образец 5 Sample 5	Образец 6 Sample 6
Метронидазол Metronidazole	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Полиэтиленгликоль-400 Polyethylene glycol-400	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
Этилендиаминтетрауксусная кислота Ethylenediaminetetraacetic acid	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Карбопол-21 Carbopol-21	1,00	–	–	–	–	–
Аммония метакрилата сополимер Ammonio Methacrylate Copolymer	–	–	–	0,50	–	–
Гидроксиэтилцеллюлоза Hydroxyethylcellulose	–	1,00	–	–	–	–
Гипромеллозы фталат Hypromellose phthalate	–	–	–	–	1,00	–
Ксантановая камедь Xanthan gum	–	–	–	–	–	1,00
Альгинат натрия Sodium alginate	–	–	1,00	–	–	–
Натрия гидроксид Sodium hydroxide	0,06	–	–	–	–	–
Вода очищенная Purified water	35,29	35,35	35,35	35,35	35,35	35,35
Натрия бензоат Sodium Benzoate	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Общая технологическая схема получения образцов гелей

ВР 1. Санитарная подготовка производства. Осуществляют очистку воздуха и воды, подготавливают дезинфицирующие растворы для санитарной обработки помещения. Подготавливают персонал, спецодежду и необходимое оборудование.

ВР 2. Подготовка сырья. Отвешивают действующие субстанции и вспомогательные компоненты.

ТП 3. Приготовление основы геля. Отмеренное количество ЭДТА и полимера заливают необходимым количеством воды очищенной, перемешивают с помощью верхнеприводной мешалки (Ultra-turrax, 1000 об/мин) при температуре 25 ± 2 °С до полного растворения (аммония метакрилата сополимер, ГЭЦ, гипромеллозы фталат, ксантановая камедь, альгинат натрия). В случае использования карбопола-21 перемешивание проводят до равномерного набухания полимера с последующей нейтрализацией гидроксидом натрия (концентрация раствора NaOH – 50 %).

ТП 4. Приготовление ТДС МД. Включает: растворение МД в ПЭГ. Отвешенное количество МД добавляют к заранее отмеренному количеству ПЭГ. Полученную ТДС нагревают в термоустойчивом химическом стакане на водяной бане 40 ± 2 °С при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (200 об/мин) до полного смешения АФС и получения коллоидного раствора.

ТП 5. Приготовление геля. ТДС МД добавляют к раствору ЭДТА, перемешивают на магнитной мешалке (200 об/мин). Далее смесь добавляют к полученной основе геля, затем с помощью турбинной мешалки (Ultra-turrax, 1500 об/мин) перемешивают до получения однородного геля.

ТП 6. Добавление консерванта. Отвешенное количество натрия бензоата растворяют в полученном геле.

УМО 7. Упаковка, маркировка и фасовка. Изготовленный гель фасуют в алюминиевые тубы (ТУ-64-7-678-90) по 30 г с внутренним лакированным покрытием на основе клея БФ-2 (ГОСТ 12-172-74).

В процессе изготовления образцов гелей №№ 4, 5, 6 выявлена физико-химическая несовместимость (коллоидная нестабильность, кристаллизация) ТДС МД с аммония метакрилата сополимером, гипромеллозы фталатом и ксантановой камедью соответственно. Для дальнейшего изучения выбраны образцы изготовленных гелей №№ 1, 2, 3.

Тест высвобождения in vitro

Результаты диализа МД из образцов МЛФ через полупроницаемую мембрану отражены на рисунке 1.

Установлено, что наличие в изучаемых образцах гелей полимеров-гелеобразователей различной природы повышает высвобождение АФС в диализную среду. Выявлено, что гели, изготовленные с применением карбопола Ультрез-21, ГЭЦ и альгината натрия, имеют различную степень высвобождения по сравнению с образцами промышленного производства. Максимум высвобождения АФС у образцов изготовленных гелей №№ 1 и 2 приходится на 5-й час, а у образца № 3 – на 4-й час. Наибольшей степенью высвобождения АФС в диализную среду среди промышленных образцов обладает образец сравнения А, максимум высвобождения АФС приходится на 5-й час. Но, несмотря на это, по сравнению с образцом А из образца изготовленного геля № 1 высвобождение АФС увеличилось в 1,3 раза, из геля № 2 – в 1,76 раза, из геля № 3 – в 1,78 раза. Данное различие в максимумах на кривых объясняется использованием в составах гелей разных по своей природе полимеров-гелеобразователей. Во всех промышленных препаратах сравнения был использован один и тот же полимер синтетического происхождения – карбомер.

Важно также отметить, что скорость высвобождения АФС в диализную среду всех разработанных образцов выше, чем у промышленных МЛФ. Наибольшую скорость высвобождения АФС за первый час из промышленных образцов демонстрирует образец А. По сравнению с образцом А скорость высвобождения МД из образца изготовленного геля № 1 выше в 1,6 раза, образца № 2 – в 1,2 раза, образца № 3 – в 2,3 раза.

Результаты микрокристаллоскопического анализа

При микроскопическом исследовании промышленных и исследуемых образцов гелей выявлена тенденция к снижению кристалличности и размера частиц МД. На рисунке 2. (образцы 1, 2) представлена субстанция МД в вазелине. Наблюдается скопление довольно крупных прямоугольных и квадратных кристаллов прозрачного цвета приблизительно равной формы и равного размера. Разработанные образцы гелей № 1, 2 и 3 (рисунок 2, образцы 3, 4, 5) представляют собой однородную прозрачную массу без выраженной внутренней структуры. Характерные для МД кристаллы практически или полностью отсутствуют. У промышленных образцов А, В и С (рисунок 2, образцы 6, 7 и 8 соответственно) наблюдается наличие кристаллов различной формы [2].

Полученные данные микрокристаллоскопии демонстрируют эффект включения ТДС МД в матрицу полимера с образованием однородной системы, а также влияние полимера на сохранение коллоидного размера частиц АФС в изготовленных МЛФ за счет своей сетчатой структуры.

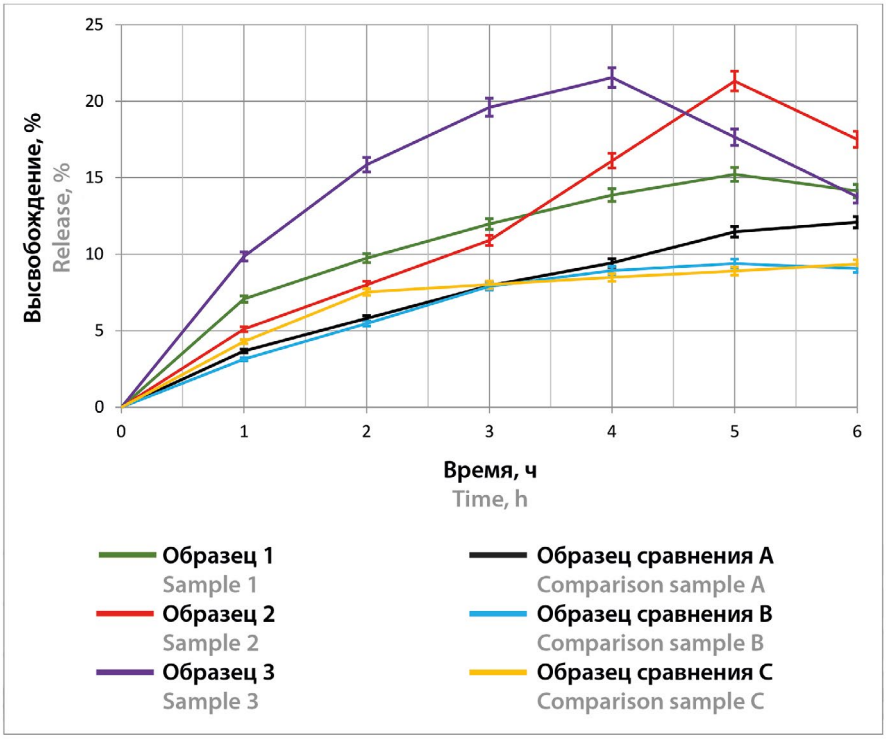


Рисунок 1. Кривые высвобождения метронидазола из мягких лекарственных форм

Figure 1. Release of metronidazole from soft dosage forms

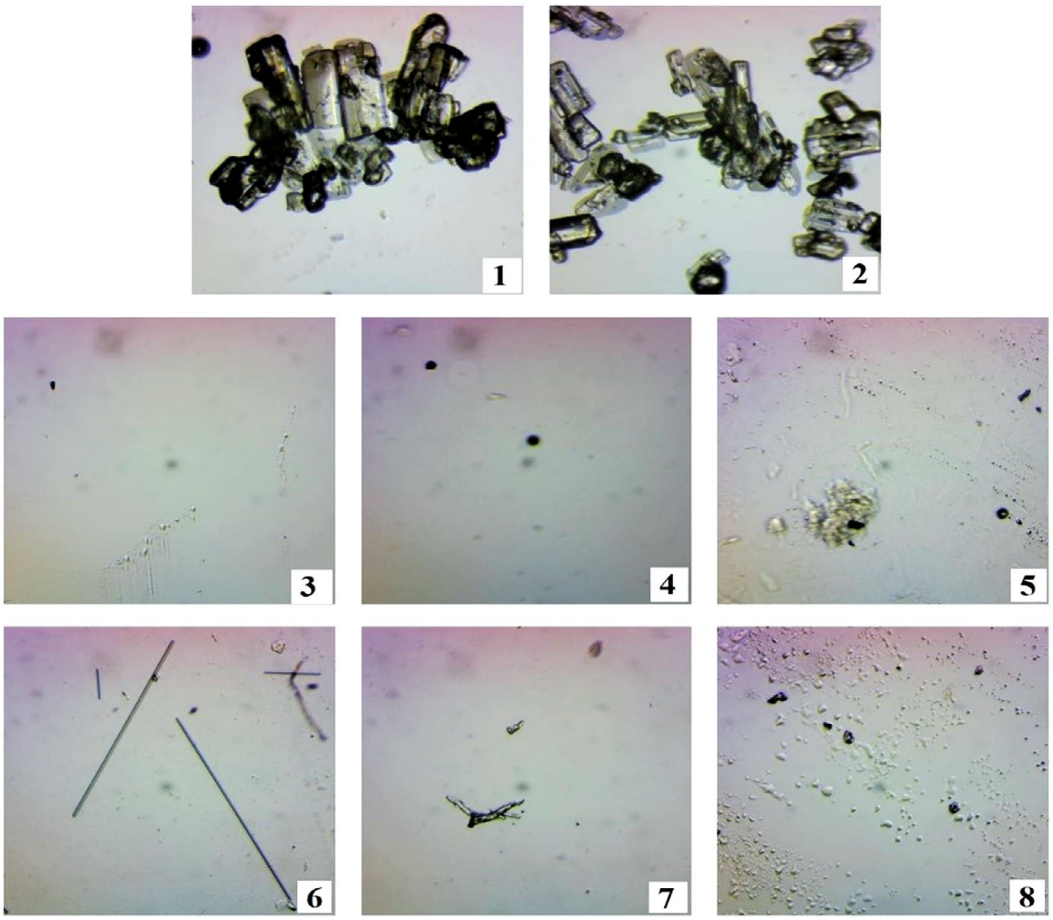


Рисунок 2. Результаты микрокристаллоскопического анализа исследуемых и промышленных образцов.

1, 2 – субстанция метронидазола в вазелине; 3 – образец 1 – изготовленный гель на основе карбопола-21; 4 – образец 2 – изготовленный гель на основе гидроксиэтилцеллюлозы; 5 – образец 3 – изготовленный гель на основе альгината натрия; 6 – образец сравнения А – промышленный образец А; 7 – образец сравнения В – промышленный образец В; 8 – образец сравнения С – промышленный образец С

Figure 3. Results of microcrystalloscopic analysis.

1, 2 – substance of metronidazole in vaseline; 3 – sample 1 – manufactured gel based on carbopol-21; 4 – sample 2 – manufactured gel based on hydroxyethyl cellulose; 5 – sample 3 – prepared gel based on sodium alginate; 6 – comparison sample A – industrial design A; 7 – comparison sample B – industrial design B; 8 – comparison sample C – industrial design C

Результаты изучения показателей стабильности (определяется ККС) и сроков годности исследуемых и промышленных образцов при ускоренном старении отражены в таблицах 2 и 3.

Диапазоны удовлетворительных значений ККС образцов гелей определены экспериментально. В образцах гелей МД с значениями ККС более 0,6 наблюдался выраженный синерезис. Так, в образце 3 на основе альгината натрия в контрольной точке 6 мес. отмечалось расслоение и выделение твердой фазы. Значения ККС менее 0,2 соответствовали отсутствию видимых изменений в структуре МЛФ, наблюдающихся в процессе ускоренного старения. Таким образом, диапазон значений ККС от 0,2 до 0,59 определен как удовлетворительный, при котором видимого расслоения гелей, а также выделения жидкой или твердой фазы из них не наблюдалось.

Исследуемые и промышленные образцы, за исключением 3-го образца, в контрольных точках представляли собой гомогенные прозрачные или полупрозрачные вязкопластичные гели от светло-желтого до белого цвета, pH которых входил в диапазон 6,20 ± 0,50. Образец 3, изготовленный на основе альгината натрия, в контрольной точке 6 мес. представлял собой гель оранжевого цвета и имел относительно других образцов завышенный показатель pH = 7,10 ± 0,5. Такое явление возможно в результате окислительно-восстановительных реакций, происходящих в продукте в результате хранения. В связи с этим у образца 3 срок годности будет меньше, чем у всех остальных изучаемых образцов.

Таблица 2. Показатели агрегативной устойчивости гелей в процессе хранения (при ускоренном старении)

Table 2. Indicators of the aggregative stability of gels during storage (under accelerated aging)

Хранение, мес. Storage, months	Значение кинетического коэффициента The value of the kinetic coefficient					
	Гель 1 Gel 1	Гель 2 Gel 2	Гель 3 Gel 3	Гель А Gel A	Гель В Gel B	Гель С Gel C
0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0,2	0	0,1	0,1
6	0,1	0,3	0,6	0,2	0,4	0,5

Таблица 3. Показатели pH водных вытяжек гелей в процессе хранения (при ускоренном старении)

Table 3. pH values of aqueous extracts of gels during storage (under accelerated aging)

Хранение, мес. Storage, months	Значение pH pH value					
	Гель 1 Gel 1	Гель 2 Gel 2	Гель 3 Gel 3	Гель А Gel A	Гель В Gel B	Гель С Gel C
0	5,97 ± 0,50	6,19 ± 0,50	6,35 ± 0,50	5,74 ± 0,50	6,10 ± 0,50	6,62 ± 0,50
3	6,05 ± 0,50	6,24 ± 0,50	6,48 ± 0,50	5,96 ± 0,50	6,15 ± 0,50	6,65 ± 0,50
6	6,21 ± 0,50	6,28 ± 0,50	7,10 ± 0,50	5,98 ± 0,50	6,33 ± 0,50	6,62 ± 0,50

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны составы и технология получения трех образцов гелей МД на основе полимеров-гелеобразователей различной химической природы с повышенной фармацевтической доступностью исследуемой АФС. Предварительное растворение метронидазола в полиэтиленгликоле-400 с последующим введением данной коллоидной системы в матрицу полимера-гелеобразователя способствует сохранению коллоидного состояния активной фармацевтической субстанции, что значительно улучшает ее растворимость в водной среде. Так, при проведении диализа через полупроницаемую мембрану установлено, что степень и скорость высвобождения метронидазола в диализную среду из разработанных образцов не уступают таковым параметрам промышленных образцов и в отдельных случаях даже превышают их. Данные микрокристаллоскопии подтверждают сохранение метронидазола в изготовленных гелях в тонкодисперсном состоянии. Результаты изучения сроков годности свидетельствуют о коллоидной стабильности и сохранении постоянства диапазонов pH образцов на основе карбопола Ультрез-21 и гидроксиэтилцеллюлозы на протяжении всего срока ускоренного старения. Образец на основе альгината натрия имеет удовлетворительную коллоидную стабильность и показатель pH в контрольной точке 3 месяца ускоренного старения, что соответствует 1 году естественного хранения.

Таким образом, применение метода создания твердых дисперсных систем метронидазола с последующим их введением в основу полимера-гелеобразователя является перспективным для повышения фармацевтической доступности и, как следствие, для улучшения биодоступности труднорастворимого в воде метронидазола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автина Н. В. Разработка состава и технологии аппликационной лекарственной формы антимикотического и антибактериального действия. *Polish Journal of Science*. 2021;44–1(44):18–19.
2. Болдина М. С., Грих В. В., Краснюк И. И. Изучение влияния полимеров различной природы на микрокристаллоскопическую картину производного имидазола в мягких лекарственных формах. В сб.: Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования по материалам XLVIII Международной научно-практической конференции. 2021.
3. Краснюк (мл). И. И., Беляцкая А. В., Краснюк И. И., Степанова О. И., Кузьменко А. Н., Луценко С. В., Касимовская Н. А., Матюшин А. А., Мазяркин Е. В., Воробьев А. Н., Нестеренко Е. П. Влияние полимеров на физико-химические свойства бензонала в твердых дисперсиях. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2021;62(1):44–48.
4. Беляцкая А. В., Кашликова И. М., Елагина А. О., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И. Нитрофураны для наружного применения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):38–47. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-38-47.
5. Краснюк И. И., Нарышкин С. Р., Краснюк И. И., Беляцкая А. В., Степанова О. И., Бобров И. С., Янкова В. Г., Рау Д. В., Воробьев А. Н. Влияние твердых дисперсий на растворимость метронидазола. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):195–204. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-195-204.

6. Грих В. В. Разработка лекарственных форм нифедипина с применением твердых дисперсий. Дис. ... канд. фарм. наук. Москва. 2018. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-lekarstvennykh-form-nifedipina-s-primeneniem-tverdykh-dispersii. Ссылка активна на 29.04.2025.
7. Грих В. В., Краснюк (мл.) И. И., Степанова О. И., Беляцкая А. В., Краснюк И. И., Тарасов В. В., Козин Д. А., Нестеренко Е. П. Разработка мягких лекарственных форм, содержащих твердые дисперсии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;1:36–38.
8. Дерябин В. А., Фарафонтова Е. П. Физическая химия дисперсных систем: учебное пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та; 2015. 88 с.
9. Кашликова И. М. Разработка состава и технологии мягких лекарственных форм производных нитрофурана. Дис. ... канд. фарм. наук. Москва. 2020. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-sostava-i-tekhnologii-myagkikh-lekarstvennykh-form-proizvodnykh-nitrofurana. Ссылка активна на 29.04.2025.
10. Кочеровец В. И. Актуальные вопросы теории и практики применения топических препаратов метронидазола в дерматологии. *Антибиотики и Химиотерапия*. 2019;64(7–8):38–43. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100043.
11. Краснюк (мл.) И. И., Нарышкин С. Р., Беляцкая А. В., Тарасов В. В., Степанова О. И., Краснюк И. И., Грих В. В., Овсянникова Л. В., Мазяркин Е. В., Воробьев А. Н. Метронидазол – 60 лет применения. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2020;1:81–90.
12. Силаева С. Ю., Беленова А. С., Сливкин А. И., Чупандина Е. Е., Нарышкин С. Р., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И. Применение твердых дисперсных систем в фармации. *Конденсированные среды и межфазные границы*. 2020;22(2):173–181. DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820.
13. Беляцкая А. В., Кашликова И. М., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И., Воробьев А. Н. Разработка состава и технологии геля с твердой дисперсией нитрофурала. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(10):55–58. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-10-55-58.
14. Елагина А. О., Беляцкая А. В., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И., Воробьев А. Н., Фатеева Т. В. Разработка шипучих гранул с твердой дисперсией фуразолидона. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):75–81. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-75-81.
15. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 2022;10(9):2055. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.
16. Kumari L., Choudhari Y., Patel P., Gupta G. D., Singh D., Rosenholm J. M., Bansal K. K., Kurmi B. D. Advancement in Solubilization Approaches: A Step towards Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Life*. 2023;13(5):1099. DOI: 10.3390/life13051099.
17. Patel K., Shah S., Patel J. Solid dispersion technology as a formulation strategy for the fabrication of modified release dosage forms: A comprehensive review. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;30(1):165–189. DOI: 10.1007/s40199-022-00440-0.
18. Tran T. T. D., Tran P. H. L. Molecular Interactions in Solid Dispersions of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):745. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080745.
19. Tran P., Pyo Y.-C., Kim D.-H., Lee S.-E., Kim J.-K., Park J.-S. Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.

REFERENCES

1. Avtina N. V. Development of the composition and technology of an application dosage form with antifungal and antibacterial action. *Polish Journal of Science*. 2021;44–1(44):18–19. (In Russ.)
2. Boldina M. S., Grikh V. V., Krasnyuk I. I. Study of the influence of polymers of various natures on the microcrystallographic pattern of an imidazole derivative in soft dosage forms. In: Modern Medicine: New Approaches and Current Research Based on the Proceedings of the XLVIII International Scientific and Practical Conference. 2021. (In Russ.)
3. Krasnyuk (Jr.) I. I., Beliatskaya A. V., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Kuzmenko A. N., Lucenko S. V., Kasimovskaya N. A., matyushin A. A., Mazyarkin E. V., Vorob'yov A. N., Nesterenko E. P. Effect of polymers on the physical and chemical properties of benzonal in solid dispersions. *Moscow University Bulletin. Series 2. Chemistry*. 2021;62(1):44–48. (In Russ.)
4. Beliatskaya A. V., Kashlikova I. M., Elagina A. O., Krasnyuk (jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I. Nitrofurans for External Use (Review). *Drug development & registration*. 2019;8(2):38–47. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-38-47.
5. Krasnyuk (Jr.) I. I., Naryshkin S. R., Krasnyuk I. I., Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Bobrov I. S., Yankova V. G., Rau J. V., Vorobiev A. N. Effect of solid dispersions on the solubility of metronidazole. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):195–204. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-195-204.
6. Grikh V. V. Development of dosage forms of nifedipine using solid dispersions. [Dissertation.] Moscow. 2018. Available at: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-lekarstvennykh-form-nifedipina-s-primeneniem-tverdykh-dispersii. Accessed: 29.04.2025. (In Russ.)
7. Grih V. V., Krasnyuk (jr.) I. I., Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnyuk I. I., Tarasov V. V., Kozin D. A., Nesterenko E. P. Development of producing soft medicinal forms containing solid dispersion. *Drug development & registration*. 2018;(1):36–38. (In Russ.)
8. Deryabin V. A., Farafontova E. P. Physical chemistry of dispersed systems: a tutorial. Ekaterinburg: Izdatelstvo Uralskogo universiteta; 2015. 88 p. (In Russ.)
9. Kashlikova I. M. Development of the composition and technology of soft dosage forms of nitrofuran derivatives. [Dissertation.] Moscow. 2020. Available at: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-sostava-i-tekhnologii-myagkikh-lekarstvennykh-form-proizvodnykh-nitrofurana. Accessed: 29.04.2025. (In Russ.)
10. Kocherovets V. I. Theory and Practice of the Use of Metronidazole Topical Preparations in Dermatology. *Antibio-*

tics and Chemotherapy. 2019;64(7–8):38–43. (In Russ.) DOI: 10.24411/0235-2990-2019-100043.

11. Krasnyuk (ml.) I. I., Naryshkin S. R., Belyackaya A. V., Tarasov V. V., Stepanova O. I., Krasnyuk I. I., Grih V. V., Ovsyannikova L. V., Mazyarkin E. V., Vorob'yov A. N. Metronidazole – 60 years of use. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;1:81–90.
12. Silaeva S. Y., Belenova A. S., Slivkin A. I., Chupandina E. E., Naryshkin S. R., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I. Use of Solid Dispersion Systems in Pharmacy. *Condensed Matter and Interphases*. 2020;22(2):173–181. DOI: 10.17308/kcmf.2020.22/2820.
13. Belyatskaya A. V., Kashlikova I. M., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Vorob'ev A. N. Development of composition and production technology of gels containing solid dispersion of nitrofural. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(10):55–58. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-10-55-58.
14. Elagina A. O., Beliatskaya A. V., Krasnyuk (Jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I., Vorob'yov A. N., Fateeva T. V. Development of Effervescent Granules with Solid Dispersion of Furazolidone. *Drug development & registration*. 2022;11(1):75–81. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-75-81.
15. Bhalani D. V., Nutan B., Kumar A., Singh Chandel A. K. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. *Biomedicines*. 2022;10(9):2055. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.
16. Kumari L., Choudhari Y., Patel P., Gupta G. D., Singh D., Rosenholm J. M., Bansal K. K., Kurmi B. D. Advancement in Solubilization Approaches: A Step towards Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Life*. 2023;13(5):1099. DOI: 10.3390/life13051099.
17. Patel K., Shah S., Patel J. Solid dispersion technology as a formulation strategy for the fabrication of modified release dosage forms: A comprehensive review. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;30(1):165–189. DOI: 10.1007/s40199-022-00440-0.
18. Tran T. T. D., Tran P. H. L. Molecular Interactions in Solid Dispersions of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):745. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080745.
19. Tran P., Pyo Y.-C., Kim D.-H., Lee S.-E., Kim J.-K., Park J.-S. Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.

АНАЛИТИКА ЭКСПО

Единственная в России
межотраслевая выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

22–24.04.2026

Москва, Крокус Экспо



Забронируйте стенд

analitikaexpo.com

0+

ITE ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.453.6; 582.998.1

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2233

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка состава и технологии таблеток для рассасывания с экстрактом *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak с применением концепции Quality by Design

А. М. Джакиянов[1], Ч. И. Ридванов[2], Ж. Н. Исаев[3], Г. Т. Жумашова[1], Т. С. Бекежанова[1], Р. И. Кулманбетов[1], Е. В. Талгаева[1], Ж. Ж. Туруспаева[1], З. Б. Сакипова[1], М. К. Сулейменов[1]✉

[1] Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет им. С. Д. Асфендиярова» (НАО «КазНМУ»). 050012, Республика Казахстан, г. Алма-Ата, ул. Толе би, д. 94

[2] Товарищество с ограниченной ответственностью «Абди Ибрахим Глобал Фарм». 040703, Республика Казахстан, Алматинская область, Илийский район, с. Мухаметжан Туймебаев, участок Промзона, здание 282

[3] Автономная организация образования «Назарбаев Университет» (АОО «Назарбаев Университет»). 010000, Республика Казахстан, г. Астана, проспект Кабанбай батыра, д. 53

✉ **Контактное лицо:** Сулейменов Марат Камытбекович. **E-mail:** suleimenov.m@kaznmu.kz

ORCID: А. М. Джакиянов – https://orcid.org/0000-0001-5239-9429;
Ч. И. Ридванов – https://orcid.org/0009-0003-3689-1757;
Ж. Н. Исаев – https://orcid.org/0009-0000-6832-6320;
Г. Т. Жумашова – https://orcid.org/0000-0002-5997-0584;
Т. С. Бекежанова – https://orcid.org/0000-0002-6088-5002;
Р. И. Кулманбетов – https://orcid.org/0000-0002-9631-0112;
Е. В. Талгаева – https://orcid.org/0009-0006-5143-2841;
Ж. Ж. Туруспаева – https://orcid.org/0009-0009-3052-8176;
З. Б. Сакипова – https://orcid.org/0000-0003-1400-1971;
М. К. Сулейменов – https://orcid.org/0009-0005-6902-6262.

Статья поступила: 21.11.2025 **Статья принята в печать:** 30.01.2026 **Статья опубликована:** 30.01.2026

Резюме

Введение. В статье представлена разработка технологии получения таблеток для рассасывания методом прямого прессования с экстрактом сухим *Ajania fruticulosa*. Концепция Quality by Design (QbD) отражает современный подход к фармацевтической разработке, основанный на идентификации и контроле критических атрибутов качества (Critical Quality Attributes, CQA) и критических параметрах процесса (Critical Process Parameters, CPP), определяющих их вариабельность. Применение статистического планирования экспериментов (Design of Experiments, DoE) позволяет количественно оценить влияние технологических переменных и их взаимодействий, оптимизировать условия производства, снизить объем экспериментальных серий и обеспечить управляемость технологического процесса.

Цель. Разработка состава и технологии получения таблеток для рассасывания с экстрактом сухим *Ajania fruticulosa* методом прямого прессования с применением принципов концепции QbD и DoE.

Материалы и методы. В качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ) использован стандартизированный согласно Фармакопее ЕАЭС экстракт сухой *Ajania fruticulosa*, полученный методом мацерации с ультразвуковой интенсификацией. Таблетки для рассасывания получены методом прямого прессования с варьированием концентрации талька (0,1–3,0 %), коповидона (2,0–5,0 %) и давления прессования (15–30 кН). В качестве CQA выбраны распадаемость и истираемость. Планирование эксперимента и статистический анализ проведены с использованием программного обеспечения Minitab Statistical Software 22.3.0 (LLC "Minitab", США) с применением модуля DoE. Распадаемость и истираемость определяли в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС на аппаратах ZT 320 и TAR 220 (ERWEKA GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение. Оптимальная концентрация АФИ составила 1,5 %. Согласно результатам DoE, статистически значимое влияние на распадаемость оказывали содержание коповидона и давление прессования, в то время как вклад талька был незначительным. Оптимальные параметры: коповидон – 5 %, тальк – 2 %, давление прессования – 22 кН. При этих условиях распадаемость составила 12,9 мин, истираемость – 0,50 %, индекс общей желательности $D = 0{,}8168$.

© Джакиянов А. М., Ридванов Ч. И., Исаев Ж. Н., Жумашова Г. Т., Бекежанова Т. С., Кулманбетов Р. И., Талгаева Е. В., Туруспаева Ж. Ж., Сакипова З. Б., Сулейменов М. К., 2026

© Jakiyanov A. M., Ridvanov C. I., Issayev Zh. N., Zhumashova G. T., Bekezhanova T. S., Kulmanbetov R. I., Talgayeva Y. V., Turuspayeva Zh. Zh., Sakipova Z. B., Suleimenov M. K., 2026

Заключение. Реализация концепции QbD в сочетании с DoE обеспечила научно обоснованный подход к разработке таблеток для рассасывания с экстрактом сухим *Ajania fruticulosa*. Разработанные таблетки для рассасывания соответствует требованиям Фармакопеи ЕАЭС и рекомендованы для масштабирования и промышленного производства.

Ключевые слова: *Ajania fruticulosa*, аяния кустарничковая, таблетки для рассасывания, прямое прессование, DoE, QbD

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

Вклад авторов. А. М. Джакиянову принадлежит концепция и дизайн работы, осуществление основных этапов исследования. З. Б. Сакипова, Г. Т. Жумашова, Т. С. Бекежанова осуществляли основные этапы исследования. Ч. И. Ридванов, Ж. Н. Исаев, Р. И. Кулманбетов проводили анализ и обработку полученных данных. М. К. Сулейменов, Е. В. Талгаева, Ж. Ж. Туруспаева участвовали в обсуждении результатов и интерпретации данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Джакиянов А. М., Ридванов Ч. И., Исаев Ж. Н., Жумашова Г. Т., Бекежанова Т. С., Кулманбетов Р. И., Талгаева Е. В., Туруспаева Ж. Ж., Сакипова З. Б., Сулейменов М. К. Разработка состава и технологии таблеток для рассасывания с экстрактом *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak с применением концепции Quality by Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):85–95. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2233

Development of the formulation and manufacturing process of lozenges with *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak dry extract using the Quality by Design concept

Amangeldy M. Jakiyanov[1], Chakho I. Ridvanov[2], Zhanpeis N. Issayev[3], Gulsim T. Zhumashova[1], Tolkyn S. Bekezhanova[1], Ruslan I. Kulmanbetov[1], Yelizaveta V. Talgayeva[1], Zhanel Zh. Turuspayeva[1], Zuriyadda B. Sakipova[1], Marat K. Suleimenov[1]✉

[1] Asfendiyarov Kazakh National Medical University. 94, Tole bi str., Almaty, 050012, Republic of Kazakhstan
[2] Limited Liability Partnership «ABDI IBRAHIM GLOBAL FARM». Building 282, section Promzona, village Mukhametzhan Tuimebaev, Ilisky district, Almaty region, 040703, Republic of Kazakhstan
[3] Autonomous Organisation of Education "Nazarbayev University". 53, prospect Kabanbay Batyra, Astana, 010000, Republic of Kazakhstan

✉ **Corresponding author:** Marat K. Suleimenov. **E-mail:** suleimenov.m@kaznmu.kz

ORCID: Amangeldy M. Jakiyanov – https://orcid.org/0000-0001-5239-9429;
Chakho I. Ridvanov – https://orcid.org/0009-0003-3689-1757;
Zhanpeis N. Issayev – https://orcid.org/0009-0000-6832-6320;
Gulsim T. Zhumashova – https://orcid.org/0000-0002-5997-0584;
Tolkyn S. Bekezhanova – https://orcid.org/0000-0002-6088-5002;
Ruslan I. Kulmanbetov – https://orcid.org/0000-0002-9631-0112;
Yelizaveta V. Talgayeva – https://orcid.org/0009-0006-5143-2841;
Zhanel Zh. Turuspayeva – https://orcid.org/0009-0009-3052-8176;
Zuriyadda B. Sakipova – https://orcid.org/0000-0003-1400-1971;
Marat K. Suleimenov – https://orcid.org/0009-0005-6902-6262.

Received: 21.11.2025 **Accepted:** 30.01.2026 **Published:** 30.01.2026

Abstract

Introduction. This article presents the development of a technology for obtaining lozenges containing *Ajania fruticulosa* dry extract using the direct compression method. The Quality by Design (QbD) concept reflects a modern approach to pharmaceutical development based on the identification and control of Critical Quality Attributes (CQA) and Critical Process Parameters (CPP) that determine their variability. The application of Design of Experiments (DoE) allows for the quantitative assessment of the influence of technological variables and their interactions, optimization of production conditions, reduction of experimental series volume, and ensuring the control of the technological process.

Aim. To develop the composition and technology of lozenges with *Ajania fruticulosa* dry extract using the direct compression method and applying the principles of the QbD concept.

Materials and methods. A standardized *Ajania fruticulosa* dry extract, obtained by maceration with ultrasonic intensification in accordance with the EAEU Pharmacopoeia, was used as the Active Pharmaceutical Ingredient (API). The lozenges were obtained by the direct compression method with varying concentrations of talc (0.1–3.0 %), copovidone (2.0–5.0 %), and compression pressure (15–30 kN). Disintegration time and friability were chosen as the CQAs. Experimental design and statistical analysis were performed using Minitab Statistical Software 22.3.0 (LLC "Minitab", USA) with the DoE module. Disintegration time and friability were determined in accordance with the requirements of the EAEU Pharmacopoeia using ZT 320 and TAR 220 apparatuses (ERWEKA GmbH, Germany).

Results and discussion. The optimal API concentration was 1.5 %. According to the DoE results, the copovidone content and compression pressure had a statistically significant effect on the disintegration time, while the contribution of talc was insignificant. The optimal parameters were: copovidone – 5 %, talc – 2 %, compression force – 22 kN. Under these conditions, the disintegration time was 12.9 min, friability was 0.50 %, and the overall desirability index $D = 0.8168$.
Conclusion. The implementation of the QbD concept in combination with DoE provided a scientifically grounded approach to the development of lozenges with *Ajania fruticulosa* dry extract. The developed lozenges meet the requirements of the EAEU Pharmacopoeia and are recommended for scale-up and industrial production.

Keywords: *Ajania fruticulosa*, lozenges, direct compression, DoE, QbD

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. Amangeldy M. Jakiyanov is credited with the concept and design of the work and carried out the main stages of the research. Zuriyadda B. Sakipova, Gulsim T. Zhumashova, Tolkyn S. Bekezhanova, Ruslan I. Kulmanbetov carried out the main stages of the research. Chakho I. Ridvanov and Zhanpeis N. Issayev, performed the analysis and processing of the obtained data. Marat K. Suleimenov, Yelizaveta V. Talgayeva, and Zhanel Zh. Turuspayeva participated in the discussion of the results and interpretation of the data. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the article text.

For citation: Jakiyanov A. M., Ridvanov C. I., Issayev Zh. N., Zhumashova G. T., Bekezhanova T. S., Kulmanbetov R. I., Talgayeva Y. V., Turuspayeva Zh. Zh., Sakipova Z. B., Suleimenov M. K. Development of the formulation and manufacturing process of lozenges with *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak dry extract using the Quality by Design concept. *Drug development & registration*. 2026;15(1):85–95. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2233

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

QbD (*англ.* Quality by Design)	Качество путем разработки
DoE (*англ.* Design of Experiments)	Моделирование/планирование экспериментов
CQA (*англ.* Critical Quality Attributes)	Критические атрибуты качества
CPP (*англ.* Critical Process Parameters)	Критические параметры процесса
АФИ	Активный фармацевтический ингредиент
RSM (*англ.* Response Surface Methodology)	Методология поверхности отклика
ICH Q8(R2) – Pharmaceutical development	ICH Q8(R2) «Фармацевтическая разработка»

ВВЕДЕНИЕ

Таблетки для рассасывания относятся к твердым лекарственным формам, широко применяемым при терапии инфекционно-воспалительных заболеваний ротоглотки. Фармакологическое действие достигается за счет высвобождения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) непосредственно в полости рта, что обеспечивает локальное воздействие на очаг воспаления [1, 2].

В качестве АФИ в настоящем исследовании выбран экстракт сухой из надземной части растения *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljakov – многолетнего растения семейства *Asteraceae*, произрастающего в южных и восточных регионах Казахстана [3]. Фитохимический профиль растения включает флавоноиды (в том числе ахилицин и кверцетин), терпеноиды (цинеол, борнеол, α-амирин) и фенольные кислоты, включая хлорогеновую. Комплекс биологически активных веществ экстракта сухого *Ajania fruticulosa* определяет антибактериальную и противовоспалительную активность [4–7]. По результатам доклинических исследований субстанция отнесена к V классу опасности по ГОСТ 12.1.007–76 («практически неопасные вещества») при $ЛД_{50}$ 5000 мг/кг массы тела, что подтверждает благоприятный профиль безопасности и обосновывает использование экстракта сухого *Ajania fruticulosa* в качестве АФИ.

Современные подходы к фармацевтической разработке ориентированы на концепцию Quality by Design (QbD), изложенную в руководстве ICH Q8(R2)[1],

[1] ICH guideline Q8(R2) on pharmaceutical development. Step 5. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf. Accessed: 14.01.2025.

предусматривающую научно обоснованное проектирование качества лекарственной формы на основе глубокого понимания взаимосвязи между характеристиками исходного сырья, критическими параметрами процесса (Critical Process Parameters, CPP) и критическими атрибутами качества (Critical Quality Attributes, CQA). В рамках концепции QbD для количественной оценки влияния факторов состава и параметров прессования на CQA применяют планирование эксперимента (Design of Experiments, DoE), позволяющее построить статистические модели, выявить значимые переменные и оптимизировать состав и технологический процесс с минимальным числом экспериментальных серий [8–10].

Цель исследования – разработка состава и технологии получения таблеток для рассасывания с экстрактом сухим *Ajania fruticulosa* методом прямого прессования с применением принципов концепции QbD и DoE.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве АФИ использован стандартизированный согласно Фармакопее ЕАЭС экстракт сухой *Ajania fruticulosa* (АФИ), полученный методом мацерации с ультразвуковой интенсификацией по технологии, защищенной патентом на полезную модель Республики Казахстан № 7449 от 16 сентября 2022 г. [7].

Вспомогательные вещества. 90%-й спирт этиловый, соответствующий нормам Государственной фармакопеи Республики Казахстан I (ГФ РК), т. 2 [с. 581–583] (ТОО «Талгар-Спирт», Казахстан); сорбитол, соответствующий нормам Ph. Eur. [с. 2963] (Roquette, Франция); тальк, соответствующий нормам Фармакопеи ЕАЭС, т. I, ч. 1 [с. 456] (Imerys, Италия); магния стеарат, соответствующий нормам ГФ РК I, т. 2 [с. 319] (Peter Greven Nederland C.V., Нидерланды); масло мяты перечной, соответствующее нормам Ph. Eur. [с. Монография 0405] (Symrise AG, Германия); коповидон (KoVidone® VA64), соответствующий нормам ГФ РК I, т. 3 [с. 442] (BASF SE, Германия).

Методы и оборудование

Получение таблеток для рассасывания методом прямого прессования

Таблетки для рассасывания получали методом прямого прессования в соответствии с технологией, защищенной патентом Республики Казахстан на полезную модель № 11229 от 3 октября 2025 г. [11]. Все твердые компоненты композиции – АФИ, сорбитол (наполнитель), коповидон (связующее), тальк (скользящее вещество) и магния стеарат (антифрикционное вещество) – предварительно просеивают через сито с размером ячеек 0,5 мм (АСВ-300, Россия) для обеспечения однородного гранулометрического состава.

Навески АФИ и части сорбитола взвешивают в соотношении 1:10 на аналитических весах AV264C Adventurer Pro (OHAUS Corporation, Швейцария) и загружают в двухконусный смеситель ERWEKA DKM с приводным блоком AR 403 (ERWEKA GmbH, Германия). Смешивание проводят до получения однородной смеси.

К полученной смеси последовательно добавляют оставшуюся часть сорбитола, коповидон, масло мяты перечной (корригент вкуса) и тальк. Смешивание осуществляют при температуре 30–40 °C до формирования однородной таблеточной массы. Затем вводят магния стеарат и проводят финальное смешивание в течение 5–10 мин с контролем влажности в пределах 2,5–3,0 %.

Полученную таблеточную массу подвергают прессованию на одностанционном таблеточном прессе CPR-6 (Dott. Bonapace & C. S.r.l., Италия) при давлении 15–30 кН. Средняя масса одной таблетки составляет 250 мг. Готовые таблетки упаковывают в блистерные упаковки из ПВХ/алюминиевой фольги и маркируют в соответствии с требованиями нормативной документации.

Планирование эксперимента DoE

Оптимизацию состава и параметров прямого прессования проводили с применением DoE в Minitab Statistical Software 22.3.0 (LLC "Minitab", США) с использованием подхода поверхности отклика (Response Surface Methodology, RSM). В качестве варьируемых факторов (X) выбраны следующие параметры: тальк в количестве 0,1–3,0 %, коповидон в количестве 2,0–5,0 % и давление прессования 15,0–30,0 кН. В качестве отклика (Y) выбраны распадаемость (мин) и истираемость (%). Диапазоны варьирования установлены по результатам предварительного скрининга и с учетом требований Фармакопеи ЕАЭС.

Статистическую значимость факторов и их взаимодействий оценивали на основании диаграмм Парето стандартизированных эффектов. Оптимизацию выполняли методом многокритериального отклика с одновременным учетом откликов распадаемости и истираемости.

Аналитические методы

Анализ распадаемости таблеток для рассасывания осуществляли по методике «Распадаемость таблеток и капсул» в соответствии с Фармакопеей ЕАЭС, т. I, ч. 1, 2.1.9.1 [302–304]. Для испытаний использовали тестер на распадаемость ZT320 (ERWEKA GmbH, Германия) [1].

Определение истираемости таблеток проводили в соответствии с методикой «Истираемость таблеток» согласно Фармакопее ЕАЭС, т. I, ч. 1, 2.1.9.6 [321], применяя аппарат TAR с 12-лопастным барабаном (ERWEKA GmbH, Германия) [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение оптимальной концентрации АФИ и выбор вспомогательных веществ

По результатам предварительных экспериментов оптимальная концентрация АФИ составила 1,5 %. Выбор данной концентрации обусловлен необходимостью достижения фармакологической активности при сохранении технологических параметров таблеточной массы, совместимых с методом прямого прессования. Снижение концентрации ниже 1,5 % приводило к уменьшению доли АФИ в единичной дозе без значимого улучшения CQA таблеток для рассасывания. При увеличении концентрации АФИ свыше 3 % наблюдалось ухудшение сыпучести и рост гигроскопичности таблеточной массы, что делает невозможным получение таблеток без дополнительных стадий гранулирования. Аналогичные технологические ограничения описаны в исследованиях по разработке таблеток, содержащих экстракт *Merremia tridentata* [12] и измельченный *Atriplex halimus* [13].

Выбор вспомогательных веществ основывался на особенностях растительного АФИ и фармакопейных требованиях к лекарственной форме для рассасывания. В качестве наполнителя использован сорбитол – водорастворимое вещество со сладким вкусом и высокой собственной текучестью, обеспечивающее равномерное распределение компонентов в таблеточной массе и приемлемые органолептические свойства [14]. Применение коповидона в качестве связующего обеспечивает необходимую прочность таблеток за счет высокой способности к пластической деформации, способствуя формированию прочной межчастичной связи при прессовании [15]. Тальк применяется в качестве смазывающего агента, способствующего снижению межчастичного трения и предотвращению прилипания таблеточной массы к рабочим поверхностям оборудования. Верхний предел содержания талька 3,0 % принят как технологическое ограничение, поскольку увеличение доли смазывающего компонента способно снижать проницаемость матрицы и замедлять распадаемость таблеток [1, 16]. Магния стеарат вводится в минимальной (0,1 %) концентрации, достаточной для снижения силы выталкивания и предупреждения адгезии таблеток к пуансонам [17]. Для маскировки горького вкуса растительной субстанции в состав включено эфирное масло мяты перечной.

Планирование эксперимента DoE

Планирование эксперимента выполнено в рамках концепции QbD с применением методологии DoE, направленной на количественную оценку влияния состава и параметров прямого прессования на CQA таблеток для рассасывания. Подход ориентирован на установление функциональных зависимостей «фактор – отклик», построение статистически значимых моделей и последующее определение области рабочих параметров, обеспечивающей достижение целевых значений показателей качества.

Выбор CQA основан на рискориентированном анализе технологии прямого прессования таблеточной массы, содержащей гигроскопичную растительную субстанцию. В качестве откликов выбраны распадаемость и истираемость, отражающие соответственно способность прессованной матрицы к дезинтеграции после смачивания и механическую прочность таблеток при выталкивании, фасовке и транспортировании. Указанные показатели чувствительны к изменению состава и давления прессования и формализуют технологический компромисс между проницаемостью структуры и прочностью межчастичных связей [18, 19].

На основании анализа литературы, результатов предварительных скрининговых экспериментов и фармакопейных требований в качестве варьируемых факторов выбраны: содержание талька (0,1–3,0 %), содержание коповидона (2,0–5,0 %) и давление прессования (15–30 кН). Диапазоны факторов обеспечивают технологическую реализуемость процесса прямого прессования и соответствие требованиям Фармакопеи ЕАЭС. Комбинации, приводящие к превышению допустимого содержания талька более 3,0 %, из экспериментального плана исключены.

Экспериментальная матрица сформирована по методологии RSM и включает 20 экспериментальных серий с центральными точками для оценки нелинейных эффектов и воспроизводимости модели. План эксперимента приведен в таблице 1. Рандомизация последовательности экспериментов применена для минимизации систематических ошибок, связанных с изменением свойств таблеточной массы и параметров оборудования во времени.

Анализ влияния варьируемых факторов на CQA, оптимизация

Для интерпретации результатов Design of Experiments и идентификации факторов, оказывающих определяющее влияние на CQA таблеток для рассасывания, выполнено ранжирование стандартизированных эффектов с визуализацией в виде диаграмм Парето.

Анализ диаграммы Парето стандартизированных эффектов для распадаемости (рисунок 1, А) показал, что статистически значимое влияние на показатель оказывает содержание коповидона (фактор B), стандартизированный эффект которого превышает критическое значение $t = 2{,}262$ при уровне значимости $\alpha = 0{,}05$. Вторым по значимости фактором выступает давление прессования (фактор C). Вклад талька (фактор A) в пределах исследуемого диапазона статистической значимости не достигал ($p > 0{,}05$). Существенная значимость квадратичных членов A^2 и C^2 ($p < 0{,}05$) указывает на наличие нелинейной зависимости распадаемости от уровня данных факторов и отражает

Таблица 1. Планирование экспериментов в процессе разработки состава и технологии получения таблеток для рассасывания

Table 1. Experimental Design in the Development of the Composition and Manufacturing Process of Lozenges

Порядок Run Order	Тип точки Pt Type	X			Y	
		Тальк, % Talcum, %	Коповидон, % Copovidone, %	Давление, кН Pressure, kN	Распадаемость, мин Disintegration, min	Истираемость, % Friability, %
1	1	1,00000	5,00000	15,0000	11	0,55
2	1	3,00000	2,00000	30,0000	12	1,04
3	0	2,00000	5,00000	22,5000	13	0,47
4	0	2,00000	3,50000	22,5000	11	0,65
5	1	1,00000	2,00000	15,0000	9	1,21
6	1	3,00000	5,00000	30,0000	15	0,38
7	–1	3,68179	3,50000	22,5000	*	*
8	–1	2,00000	3,50000	35,1134	10	0,35
9	0	2,00000	5,00000	22,5000	13	0,47
10	0	2,00000	5,00000	22,5000	13	0,47
11	1	1,00000	2,00000	30,0000	9	0,90
12	1	3,00000	2,00000	15,0000	9	1,24
13	1	1,00000	5,00000	30,0000	15	0,62
14	–1	2,00000	3,50000	9,8866	8	1,80
15	–1	0,31821	3,50000	22,5000	12	0,62
16	0	2,00000	5,00000	22,5000	13	0,47
17	–1	2,00000	0,97731	22,5000	7	1,35
18	1	3,00000	5,00000	15,0000	12	1,10
19	–1	2,00000	6,02269	22,5000	14	0,54
20	0	2,00000	3,50000	22,5000	12	0,79

Примечание. * Серия не изготавливалась вследствие превышения допустимого содержания талька (>3,0 %).

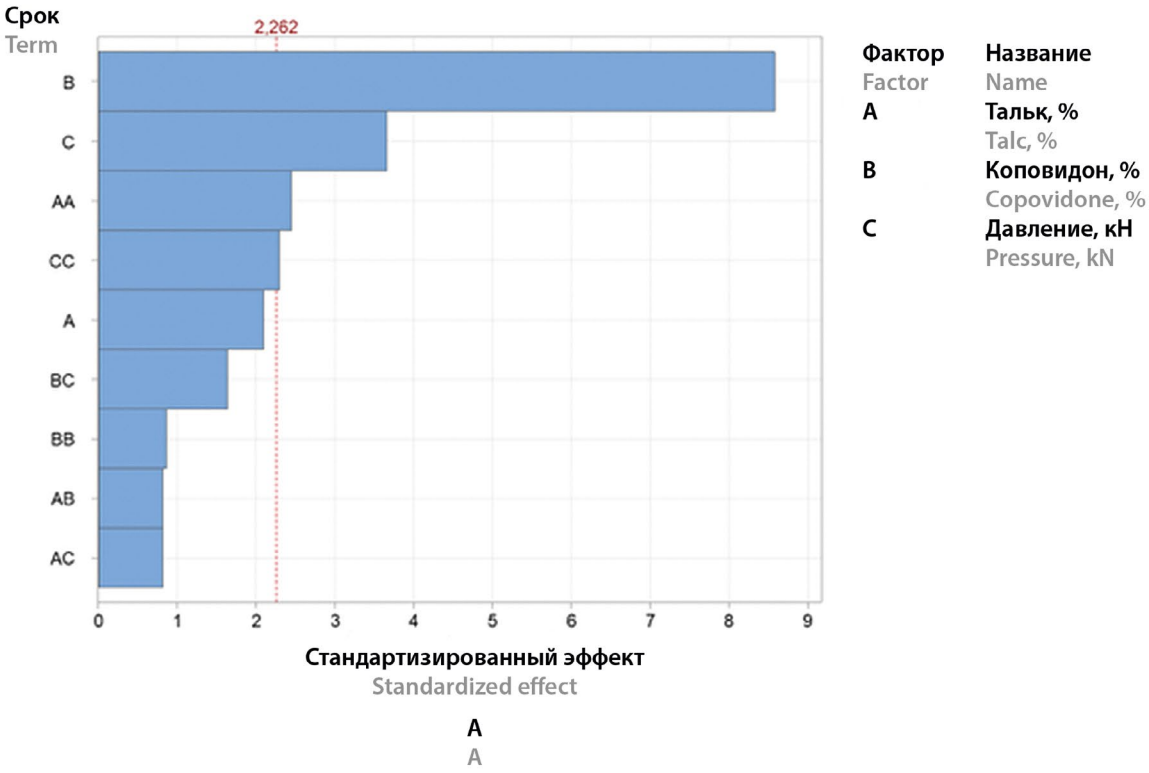
Note. * The batch was not manufactured due to exceeding the permissible talc content (>3.0 %).

существование оптимального диапазона параметров, за пределами которого наблюдается замедление дезинтеграции. Взаимодействия между факторами A, B и C статистически значимыми не являлись и из итоговой предиктивной модели исключены.

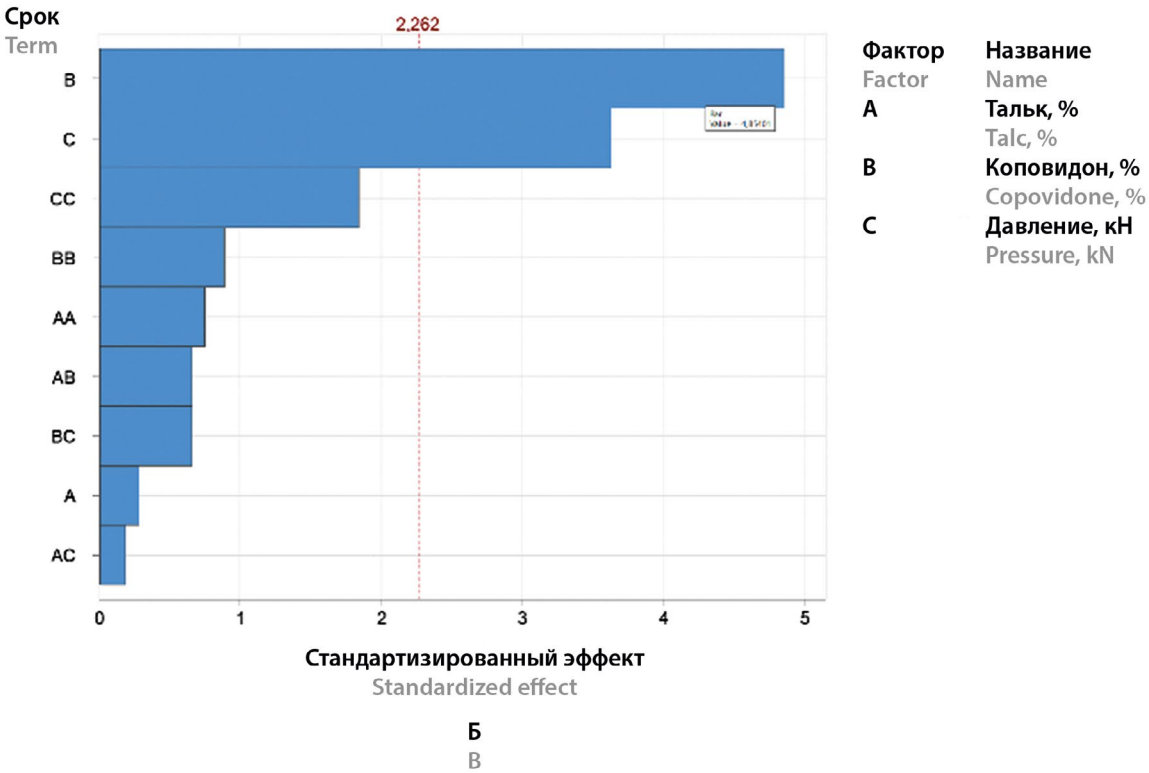
По диаграмме Парето стандартизованных эффектов (рисунок 1, Б) установлено, что на истираемость статистически значимое влияние оказывает фактор коповидон (B), чей стандартизованный эффект существенно превышает критическое значение $t = 2{,}262$ (при $\alpha = 0{,}05$). Вторым по значимости фактором является давление прессования (C). Влияние талька (A) оказалось статистически незначимым ($p > 0{,}05$) в пределах исследуемого диапазона. В отличие от модели времени распадаемости, квадратичные члены A^2, B^2, C^2 и взаимодействия AB, AC, BC не демонстрировали статистической значимости ($p > 0{,}05$), что указывает на преимущественно линейный характер зависимости истираемости от факторов в изученной области параметров.

Контурные графики при фиксированном содержании талька 2%-го иллюстрируют согласованную направленность влияния коповидона и давления прессования на оба отклика (рисунок 2, А, Б). Для распадаемости (рисунок 2, А) повышение концентрации коповидона и давления прессования сопровождалось увеличением времени, что согласуется с уплотнением матрицы таблетки и усилением межчастичных связей, ограничивающих доступ среды к внутреннему объему. Минимальные значения времени распадаемости формируются в области низких уровней обоих факторов. Характер изолиний подтверждает преимущественно аддитивное влияние без выраженного взаимодействия.

Для истираемости (рисунок 2, Б) увеличение концентрации коповидона и давления прессования приводило к снижению истираемости, что отражает рост механической прочности таблеток. Область минимальной истираемости располагается при высоких уровнях обоих факторов. При низкой концентрации коповидона и недостаточном давлении прессования формируются таблетки с повышенной истираемостью вследствие ограниченного развития связующей сетки и недостаточной структурной целостности.



А
A



Б
B

Рисунок 1. Диаграмма Парето стандартизированных эффектов факторов, влияющих на
А – распадаемость; Б – истираемость

Figure 1. Pareto chart of standardized effects of factors influencing:
A – disintegration time; B – friability

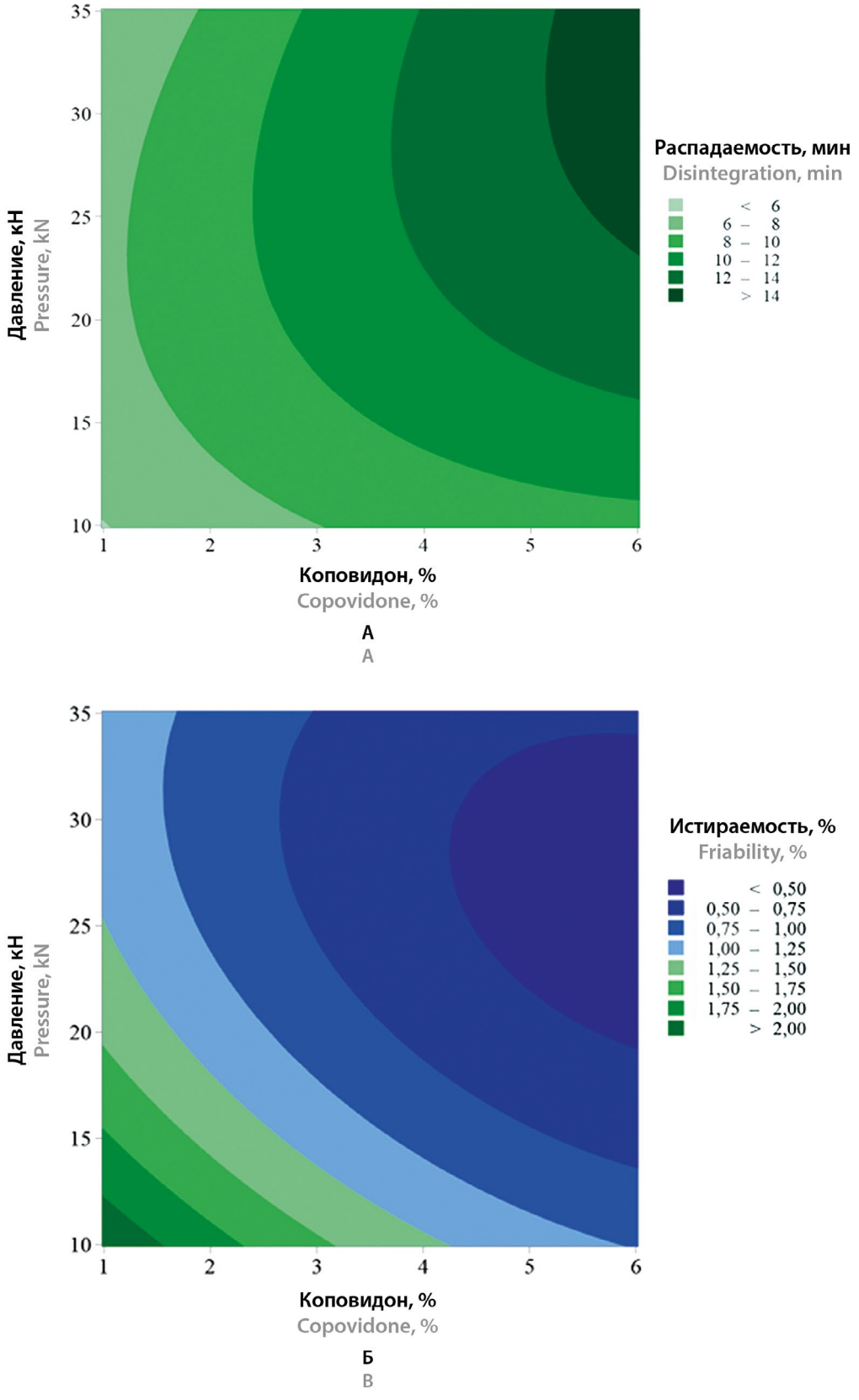


Рисунок 2. Влияние концентрации коповидона и давления прессования на CQA таблеток для рассасывания:
А – распадаемость; Б – истираемость

Figure 2. Effect of copovidone concentration and compression force on CQA of lozenges:
A – disintegration time; B – friability

Совместная интерпретация моделей распадаемости и истираемости подтверждает конкурирующую направленность влияния факторов. Повышение концентрации коповидона и давления прессования способствует снижению истираемости, одновременно приводя к увеличению распадаемости вследствие роста плотности и снижения проницаемости структуры таблетки.

С учетом выявленного технологического компромисса выполнена многокритериальная оптимизация с применением функции общей желательности и анализа профилей отклика (рисунок 3). Оптимальные уровни факторов составили: тальк – 2,0 %, коповидон – 5,0 %, давление прессования – 22 кН. Индекс общей желательности D = 0,8168; прогнозируемые значения откликов – 12,9 мин для времени распадаемости и 0,50 % для истираемости, что соответствует установленным критериям качества и требованиям Фармакопеи ЕАЭС [1].

Выбранные условия обеспечивают сбалансированное сочетание механической прочности и способности к дезинтеграции. Давление прессования 22 кН формирует достаточную прочность таблеток без перехода в область избыточного уплотнения, тогда как концентрация коповидона 5,0%-го обеспечивает развитие устойчивых межчастичных связей, ограничивая истираемость при сохранении распадаемости в целевом интервале. Содержание талька на уровне 2,0 % повышает технологичность процесса за счет улучшения реологических и трибологических характеристик таблеточной массы, при этом вклад в формирование целевых CQA в пределах исследуемого диапазона статистической значимости не достигал.

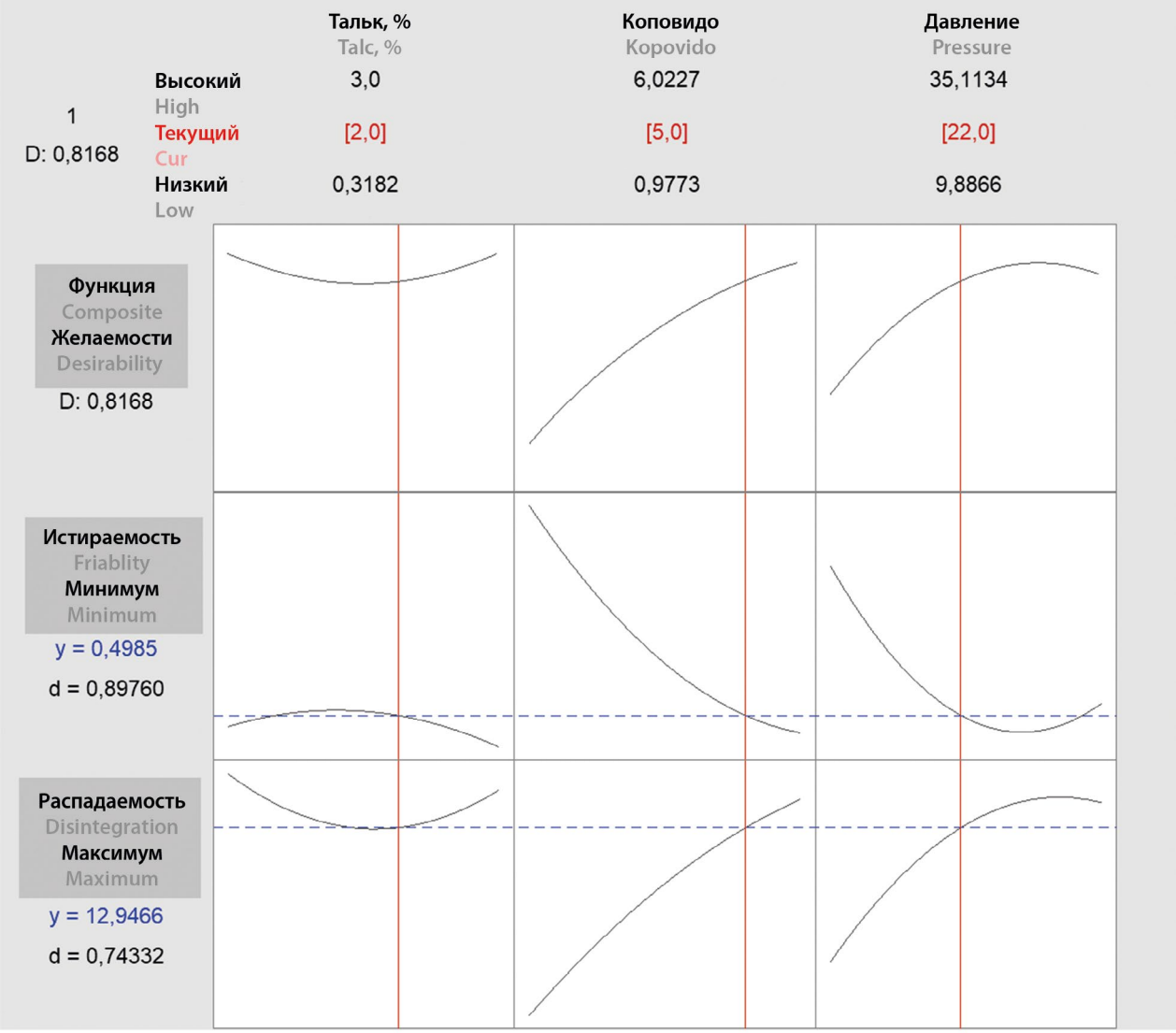


Рисунок 3. График оптимизации откликов, отражающий влияние содержания талька и коповидона, давления прессования на истираемость и распадаемость таблеток для рассасывания

Figure 3. Response optimization plot of the effects of talc and copovidone contents, compression force on lozenge friability and disintegration time

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований выполнена успешная разработка состава и технологии получения таблеток для рассасывания с экстрактом сухим *Ajania fruticulosa* по методологии DoE с использованием подхода QbD. В ходе работы установлены CQA, среди которых распадаемость и истираемость таблеток, и оценено влияние факторов, таких как концентрация талька, коповидона и давление прессования.

Результаты DoE показали, что наибольшее влияние на технологические свойства лекарственной формы оказывают концентрация коповидона и давление прессования. Установлены оптимальные технологические параметры: содержание коповидона – 5 %, талька – 2 %, давление прессования – 22 кН. При этих условиях обеспечивается достижение целевых показателей качества: распадаемость – 12,9 мин, истираемость – 0,50 %.

Полученные результаты подтверждают эффективность и научную обоснованность применения статистических методов моделирования эксперимента и концепции QbD для разработки лекарственных форм на основе растительной субстанции. Разработанный состав на основе экстракта сухого *Ajania fruticulosa* и вспомогательных веществ, совместимых с прямым методом прессования, позволяет получить технологически воспроизводимую и соответствующую требованиям Фармакопее ЕАЭС лекарственную форму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармакопея Евразийского экономического союза. Том 1, часть 2. М.: Евразийская экономическая комиссия; 2023. 460 с.
2. Ghourichay M. P., Kiaie S. H., Nokhodchi A., Javadzadeh Y. Formulation and Quality Control of Orally Disintegrating Tablets (ODTs): Recent Advances and Perspectives. *BioMed Research International.* 2021;2021:6618934. DOI: 10.1155/2021/6618934.
3. Байтенов М. С. Флора Казахстана. В 2-х томах Т. 2. Родовой комплекс флоры. Алматы: Ғылым; 2001. 280 с.
4. Liang J.-Y., Lu P.-Y., Ning A.-Q., Yang Y.-Y., Shao Y.-Z., Xu J. Chemical constituents from the aerial parts of Ajania fruticulosa. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2020;92:104124. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104124.
5. Min X., Chen J., Mu W., Huang J., Huang G., Cao J. A new dimeric sesquiterpenoid from Ajania fruticulosa. *Phytochemistry Letters*. 2025;66:60–65. DOI: 10.1016/J.PHYTOL.2025.02.001.
6. Sampietro D. A., Gomez A. de los A. Gomez A., Jimenez C. M., Lizarraga E. F., Ibatayev Z. A., Suleimen Y. M., Catalán C.A. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from medicinal plants of Kazakhstan. *Natural Product Research*. 2017;31:1464–1467. DOI: 10.1080/14786419.2016.1258560.
7. Джакиянов А. М., Сакипова З. Б., Жумашова Г. Т., Кәрім О. А. Способ получения экстракта из растительного сырья. Патент РК на полезную модель № 7449. 16.09.2022. Доступно по: https://gosreestr.kazpatent.kz/Utilitymodel/Details?docNumber=354942. Ссылка активна на 14.01.2026.
8. Gurski C. S., Edison Luna Lazo R., Aparecida Gelinsk M., Antunes Alves L., Schastai Sovinsk M., Henrique Marcondes Sari M., Hiemisch Lobo Borba H., Stumpf Tonin F., Pontarolo R., Mota Ferreira L. Quality by Design applied to pediatric-friendly formulations: a scoping review-based manufacturing process mapping for solid dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2025;108:106915. DOI: 10.1016/j.jddst.2025.106915.
9. Shahab M., Bachawala S., Gonzalez M., Nagy Z., Reklaitis G. A hybrid system for design space estimation in a rotary tablet press. *International Journal of Pharmaceutics*. 2025;678:125663. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.125663.
10. Geremia M., Bezzo F., Ierapetritou M. G. Design space determination of pharmaceutical processes: Effects of control strategies and uncertainty. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023;194:159–169. DOI: 10.1016/j.ejpb.2023.12.008.
11. Джакиянов А. М., Сакипова З. Б., Ибрагимова Л. Н., Ибраева М. Б., Калдыбаева А. М., Енсебаева Г. Б. Фармацевтическая композиция из растительной субстанции с антибактериальным и противогрибковым действием и способ ее получения. Патент РК на полезную модель № 11229. 03.10.2026. Доступно по: https://gosreestr.kazpatent.kz/Utilitymodel/Details?docNumber=429851. Ссылка активна на 14.01.2026.
12. Pham E. C., Van V. V. L., Nguyen C. V., Nguyen Duong N. T., Le Thi T. V. Formulation development, optimization, in vivo antidiabetic effect and acute toxicity of directly compressible herbal tablets containing Merremia tridentata (L.) extract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;84:104445. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104445.
13. Nait Bachir Y., Said R. M., Terki N. Z., Antar R., Slamani M., Gharbi D., Foligni R. Biopharmaceutical and Pharmacotechnical Characterization of Plant Powder Tablets Obtained by Direct Compression Process: The Case of *Atriplex halimus*. *Applied Sciences*. 2025;15:8623. DOI: 10.3390/app15158623.
14. Bolhuis G. K., Rexwinkel E. G., Zuurman K. Polyols as filler-binders for disintegrating tablets prepared by direct compaction. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009;35:671–677. DOI: 10.1080/03639040802587799.
15. Chaudhary R. S., Patel C., Sevak V., Chan M. Effect of Kollidon VA®64 particle size and morphology as directly compressible excipient on tablet compression properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;44:19–29. DOI: 10.1080/03639045.2017.1371735.
16. Ribet J., Poret K., Arseguel D., Chulia D., Rodriguez F. Talc functionality as lubricant: texture, mean diameter, and specific surface area influence. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003;29:1127–1135. DOI: 10.1081/DDC-120025870.
17. Lakio S., Vajna B., Farkas I., Salokangas H., Marosi G., Yliruusi J. Challenges in Detecting Magnesium Stearate Distribution in Tablets. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14:435–444. DOI: 10.1208/s12249-013-9927-3.
18. Tafere C., Yilma Z., Abrha S., Yehualaw A. Formulation, in vitro characterization and optimization of taste-masked orally disintegrating co-trimoxazole tablet by direct compression. *PLOS ONE*. 2021;16:e0246648. DOI: 10.1371/journal.pone.0246648.
19. Naman S., Madhavi N., Singh B., Madan J., Baldi A. Implementing risk-based quality by design for development and optimization of flavored oral disintegrating mini tablets. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;66:102799. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102799.

REFERENCES

1. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. Volume 1, part 2. Moscow: The Eurasian Economic Commission; 2023. 430 p. (In Russ.)
2. Ghourichay M. P., Kiaie S. H., Nokhodchi A., Javadzadeh Y. Formulation and Quality Control of Orally Disintegrating Tablets (ODTs): Recent Advances and Perspectives. *BioMed Research International*. 2021;2021:6618934. DOI: 10.1155/2021/6618934.
3. Baitenov M. S. Flora of Kazakhstan. In 2 volumes. Vol. 2. Generic complex of flora. Almaty: Gylym; 2001. 280 p. (In Russ.)
4. Liang J.-Y., Lu P.-Y., Ning A.-Q., Yang Y.-Y., Shao Y.-Z., Xu J. Chemical constituents from the aerial parts of Ajania fruticulosa. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2020;92:104124. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104124.
5. Min X., Chen J., Mu W., Huang J., Huang G., Cao J. A new dimeric sesquiterpenoid from Ajania fruticulosa. *Phytochemistry Letters*. 2025;66:60–65. DOI: 10.1016/J.PHYTOL.2025.02.001.
6. Sampietro D. A., Gomez A. de los A. Gomez A., Jimenez C. M., Lizarraga E. F., Ibatayev Z. A., Suleimen Y. M., Catalán C.A. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from medicinal plants of Kazakhstan. *Natural Product Research*. 2017;31:1464–1467. DOI: 10.1080/14786419.2016.1258560.
7. Jakiyanov A. M., Sakipova Z. B., Zhumashova G. T., Karim O. A. Method of obtaining an extract from plant raw materials. Utility model patent of the Republic of Kazakhstan No. 7449. 16.09.2022. Available at: https://gosreestr.kazpatent.kz/Utilitymodel/Details?docNumber=354942. Accessed: 14.01.2026. (In Russ.)
8. Gurski C. S., Edison Luna Lazo R., Aparecida Gelinsk M., Antunes Alves L., Schastai Sovinsk M., Henrique Marcondes Sari M., Hiemisch Lobo Borba H., Stumpf Tonin F., Pontarolo R., Mota Ferreira L. Quality by Design applied to pediatric-friendly formulations: a scoping review-based manufacturing process mapping for solid dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2025;108:106915. DOI: 10.1016/j.jddst.2025.106915.
9. Shahab M., Bachawala S., Gonzalez M., Nagy Z., Reklaitis G. A hybrid system for design space estimation in a rotary tablet press. *International Journal of Pharmaceutics*. 2025;678:125663. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.125663.
10. Geremia M., Bezzo F., Ierapetritou M. G. Design space determination of pharmaceutical processes: Effects of control strategies and uncertainty. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023;194:159–169. DOI: 10.1016/j.ejpb.2023.12.008.
11. Jakiyanov A. M., Sakipova Z. B., Ibragimova L. N., Ibraeva M. B., Kaldybaeva A. M., Ensebaeva G. B. Pharmaceutical composition from plant substance with antibacterial and antifungal action and method of its preparation. Utility model patent of the Republic of Kazakhstan No. 11229. 03.10.2026. Available at: https://gosreestr.kazpatent.kz/Utilitymodel/Details?docNumber=429851. Accessed: 14.01.26. (In Russ.)
12. Pham E. C., Van V. V. L., Nguyen C. V., Nguyen Duong N. T., Le Thi T. V. Formulation development, optimization, in vivo antidiabetic effect and acute toxicity of directly compressible herbal tablets containing Merremia tridentata (L.) extract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;84:104445. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104445.
13. Nait Bachir Y., Said R. M., Terki N. Z., Antar R., Slamani M., Gharbi D., Foligni R. Biopharmaceutical and Pharmacotechnical Characterization of Plant Powder Tablets Obtained by Direct Compression Process: The Case of *Atriplex halimus*. *Applied Sciences*. 2025;15:8623. DOI: 10.3390/app15158623.
14. Bolhuis G. K., Rexwinkel E. G., Zuurman K. Polyols as filler-binders for disintegrating tablets prepared by direct compaction. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009;35:671–677. DOI: 10.1080/03639040802587799.
15. Chaudhary R. S., Patel C., Sevak V., Chan M. Effect of Kollidon VA®64 particle size and morphology as directly compressible excipient on tablet compression properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;44:19–29. DOI: 10.1080/03639045.2017.1371735.
16. Ribet J., Poret K., Arseguel D., Chulia D., Rodriguez F. Talc functionality as lubricant: texture, mean diameter, and specific surface area influence. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2003;29:1127–1135. DOI: 10.1081/DDC-120025870.
17. Lakio S., Vajna B., Farkas I., Salokangas H., Marosi G., Yliruusi J. Challenges in Detecting Magnesium Stearate Distribution in Tablets. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14:435–444. DOI: 10.1208/s12249-013-9927-3.
18. Tafere C., Yilma Z., Abrha S., Yehualaw A. Formulation, in vitro characterization and optimization of taste-masked orally disintegrating co-trimoxazole tablet by direct compression. *PLOS ONE*. 2021;16:e0246648. DOI: 10.1371/journal.pone.0246648.
19. Naman S., Madhavi N., Singh B., Madan J., Baldi A. Implementing risk-based quality by design for development and optimization of flavored oral disintegrating mini tablets. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;66:102799. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102799.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.453; 615.12; 615.014.21

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2034

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и практическое применение расчетной модели процесса гранулирования в псевдоожиженном слое

О. А. Зырянов[1]✉, Г. Э. Бркич[1], Н. В. Пятигорская[1], Б. Б. Сысуев[2], М. И. Лавров[3], Д. А. Мигалев[1]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

[2] Автономная некоммерческая организация дополнительного профессионального образования «Евразийская академия надлежащих практик» (АНО «ЕАНП»). 119049, г. Москва, вн. тер. г. Муниципальный Округ Якиманка, пр-кт Ленинский, д. 9

[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Зырянов Олег Анатольевич. **E-mail:** zurianov2009@gmail.com

ORCID: О. А. Зырянов – https://orcid.org/0000-0001-9038-8720;
Г. Э. Бркич – https://orcid.org/0000-0002-3469-9062;
Н. В. Пятигорская – https://orcid.org/0000-0003-4901-4625;
Б. Б. Сысуев – https://orcid.org/0000-0002-9933-1808;
М. И. Лавров – https://orcid.org/0000-0002-9005-3223;
Д. А. Мигалев – https://orcid.org/0009-0004-0938-9195.

Статья поступила: 12.02.2025 **Статья принята в печать:** 16.02.2026 **Статья опубликована:** 20.02.2026

Резюме

Введение. Контроль генерации распределения свойств гранул продукта, в частности распределения размеров, плотности и морфологии частиц, в технологии влажного гранулирования является сложным процессом, в котором одновременно происходит ряд явлений, которые в совокупности контролируют указанные фармацевтико-технологические свойства смесей. Разработанная расчетная модель процесса гранулирования позволит создавать и проектировать процессы с уменьшенным уровнем затрат, без трудоемкой экспериментальной проверки в различных масштабах работы. Понимание того, как равномерно распределить связующее вещество с помощью расчетной модели, не только поможет контролировать распределение зародышей гранул, но и приведет к более управляемому технологическому процессу. Одним из критериев устойчивой расчетной модели процесса гранулирования является уменьшение неликвидных партий продуктов, не соответствующих спецификациям.

Цель. Применение разработанной расчетной модели для оптимизации процесса гранулирования твердых лекарственных форм.

Материалы и методы. Для разработки расчетной модели процесса гранулирования были использованы и объединены формулы определения насыпной плотности до и после уплотнения, краевого угла смачивания, насыпной плотности, эффективной пористости, уравнения гидродинамики Козени – Кармана, модифицированное дифференциальное уравнение Лукаса – Уошберна, уравнения скорости распыления и движения частиц в зоне распыления, времени проникновения капли в порошковый слой и безразмерного потока распыления. Объектом исследования экспериментального подтверждения разработанной расчетной модели процесса гранулирования являлся порошок лекарственного средства, содержащий активную фармацевтическую субстанцию на основе производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана – ТСТ-9 и подлежащий дальнейшему таблетированию. В качестве увлажнителей в экспериментальных исследованиях рассматривали использование следующих жидкостей: воды очищенной и раствора гипромеллозы. Вязкость образцов измерялась с помощью вибровискозиметра SV-10 (A&D, Япония). Экспериментальное гранулирование проводилось в установке с псевдоожиженным слоем. Для определения показателей качества смеси и гранул использовались тестер сыпучести ручной с цифровым измерителем высоты EFT-01 (Electrolab, Индия) и тестер насыпной плотности ETD-1020 (Electrolab, Индия). Поверхностное натяжение гранулирующих жидкостей измерялось на тензиометре K6 по методу отрыва кольца (метод дю Нуи) (KRÜSS GmbH, Германия).

© Зырянов О. А., Бркич Г. Э., Пятигорская Н. В., Сысуев Б. Б., Лавров М. И., Мигалев Д. А., 2026
© Zyryanov O. A., Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Sysuev B. B., Lavrov M. I., Migalev D. A., 2026

Результаты и обсуждение. Впервые представлен алгоритм вычисления параметров расчетной модели процесса гранулирования, времени проникновения капли, которое контролируется фармацевтико-технологическими характеристиками состава лекарственной формы, и безразмерного потока распыления, который регулируется параметрами процесса. Их установленные значения позволили осуществить прогноз поведения гранул и выход продукта.
Заключение. В данной работе продемонстрировано применение расчетной модели для прогнозируемого получения гранул на примере разработки технологии получения лекарственного средства на основе активной фармацевтической субстанции, являющейся производным 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана – ТСТ-9. В результате проектируемые значения расчетной модели имели подтверждение в экспериментальных исследованиях гранулирования в установке с псевдоожиженным слоем с применением различных увлажняющих жидкостей.

Ключевые слова: процесс гранулирования, нуклеация гранул, влажное гранулирование, псевдоожиженный слой

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

Вклад авторов. О. А. Зырянов – сбор, анализ и обобщение данных, вклад в концепцию, редактирование текста рукописи. Г. Э. Бркич – разработка концепции, написание и редактирование текста рукописи. Н. В. Пятигорская – утверждение окончательного варианта статьи для публикации. Б. Б. Сысуев – критический пересмотр текста. М. И. Лавров – подготовка и редактирование текста рукописи. Д. А. Мигалев – проведение экспериментальных исследований. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Зырянов О. А., Бркич Г. Э., Пятигорская Н. В., Сысуев Б. Б., Лавров М. И., Мигалев Д. А. Разработка и практическое применение расчетной модели процесса гранулирования в псевдоожиженном слое. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):96–105. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2034

Development and practical application of a computational model of the pelletizing process in a fluidized bed

Oleg A. Zyryanov[1]✉, Galina E. Brkich[1], Natalia V. Pyatigorskaya[1], Boris B. Sysuev[2], Mstislav I. Lavrov[3], Daniil A. Migalev[1]

[1] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] Autonomous non-profit organization "Eurasian Academy of Good Practices". 9, Leninsky ave., Moscow, vet. g. Yakimanka Municipal District, 119049, Russia
[3] Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Oleg A. Zyryanov. **E-mail:** zurianov2009@gmail.com

ORCID: Oleg A. Zyryanov – https://orcid.org/0000-0001-9038-8720;
Galina E. Brkich – https://orcid.org/0000-0002-3469-9062;
Natalia V. Pyatigorskaya – https://orcid.org/0000-0003-4901-4625;
Boris B. Sysuev – https://orcid.org/0000-0002-9933-1808;
Mstislav I. Lavrov – https://orcid.org/0000-0002-9005-3223;
Daniil A. Migalev – https://orcid.org/0009-0004-0938-9195.

Received: 12.02.2025 **Accepted:** 16.02.2026 **Published:** 20.02.2026

Abstract
Introduction. Controlling the generation of the distribution of the properties of product granules, in particular the size distribution, density and morphology of particles in wet granulation technology is a complex process in which a number of phenomena occur simultaneously, which collectively control the specified pharmaceutical and technological properties of mixtures. The developed computational model of the granulation process will allow you to create and design processes with a reduced cost level of expensive, time-consuming experimental verification at various scales of work. Understanding how to evenly distribute the binder using a computational model will not only help control the distribution of granule nuclei, but will also lead to a more manageable technological process. One of the criteria for a stable calculation model of the granulation process is the reduction of illiquid batches of products that do not meet specifications.
Aim. Application of the developed computational model to optimize the granulation process of solid dosage forms.
Materials and methods. To develop a computational model of the granulation process, formulas for determining the bulk density before and after compaction, the wetting edge angle, bulk density, effective porosity, the Kozeni – Karman hydrodynamics equations, the modified Lucas – Washburn differential equation, the equations of spray velocity and particle motion in the spray zone, the time of penetration of a drop into a powder layer and the dimensionless spray flow. The object of the experimental confirmation of the developed computational model of the granulation process was the powder of a medicinal product containing an active pharmaceutical substance based on a derivative of 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan – TST-9 and subject to further tableting. The following liquids were considered as humidifiers in experimental studies: purified water and hypromellose solution. The viscosity of the samples was measured using a vibration viscometer SV-10 (A&D, Japan). Experimental granulation was carried out in an installation with a fluidized bed. To determine the quality indicators

of the mixture and granules, a manual flowability tester with a digital height meter EFT-01 (Electrolab, India) and a bulk density tester were used ETD-1020 (Electrolab, India). The surface tension of granulating liquids was measured on a K6 tensiometer using the ring separation method (the due Nui method) (KRÜSS GmbH, Germany).
Results and discussion. An algorithm is presented for calculating the parameters of the computational model of the granulation process, the time of droplet penetration, which is controlled by the pharmaceutical and technological characteristics of the composition of the dosage form, and the dimensionless spray flow, which is regulated by the process parameters. Their established values made it possible to predict the behavior of granules and product yield.
Conclusion. In this paper, the application of a computational model for the predicted production of granules is demonstrated by the example of the development of a technology for obtaining a drug based on an active pharmaceutical substance that is a derivative of 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan – TST-9. As a result, the projected values of the computational model were confirmed in experimental studies of granulation in a fluidized bed installation using various moisturizing liquids.

Keywords: granulation process, nucleation of granules, wet granulation, fluidized bed

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. Oleg A. Zyryanov – data collection, analysis and summarization, contribution to the concept, editing of the manuscript. Galina E. Brkich – concept development, writing and editing of the manuscript. Natalia V. Pyatigorskaya – approval of the final version of the article for publication. Boris B. Sysuev – critical revision of the text. Mstislav I. Lavrov – preparation and editing of the manuscript. Daniil A. Migalev – conducting experimental studies. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Zyryanov O. A., Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Sysuev B. B., Lavrov M. I., Migalev D. A. Development and practical application of a computational model of the pelletizing process in a fluidized bed. *Drug development & registration*. 2026;15(1):96–105. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2034

ВВЕДЕНИЕ

Прогнозирование технологических процессов получения лекарственных форм с помощью методологии «качество путем проектирования» (QbD) целесообразно выполнять на основании как стандартных наборов характеристических измерений, так и вычисляемых физических пределов технологических процедур для сокращения объемов проведения экспериментальных исследований.

Контроль генерации распределения свойств гранул продукта, в частности распределения размеров, плотности и морфологии частиц, в технологии влажного гранулирования является сложным процессом, в котором одновременно происходит ряд явлений, которые в совокупности контролируют указанные фармацевтико-технологические характеристики состава смесей [1, 2].

Принято считать, что эти процессы сформированы из следующих уровней:

- нуклеации (первая стадия фазового перехода) и дисперсии связующего, при которых капли жидкости взаимодействуют с порошком в слое, образуя новые гранулы;
- консолидации и роста, при которых гранулы сталкиваются друг с другом. Некоторые из этих столкновений могут привести к коалесценции гранул. Гранулы также могут расти путем наслаивания порошка на существующие гранулы;
- разрыва и истирания, при которых влажные гранулы разбиваются, образуя более мелкие гранулы из-за удара об импеллеры и измельчители.

Процессы нуклеации, происходящие в зоне распыления, чрезвычайно важны для достижения хорошего распределения жидкости, что приводит к гранулированию с относительно узким интервалом распределения размеров гранул. Лучшая нуклеация происходит, когда каждая капля образует одноядерную гранулу (управляемая каплей нуклеация).

Подобное поведение смеси в грануляторе формируется регулируемыми протекающими физическими процессами/критериями:

- быстрым проникновением капли для предотвращения взаимодействия с другими, медленно проникающими каплями на поверхности слоя;
- минимальным значением скорости подачи гранулирующей жидкости на поверхность порошка.

Если управляемые процессы выйдут за пределы устанавливаемых интервалов технологии получения влажного гранулирования, в зоне распыления будут образовываться крупные гранулы или комки, и тогда потребуется механическое воздействие в грануляторе [3].

Авторы работы [4] после обширных экспериментов и наблюдений за процессом роста и деформации гранул предположили, что характер их роста является функцией двух основных параметров: максималь-

ного насыщения пор порошка жидкостью и величины деформации во время удара. В частности, существуют две области роста, где процесс нуклеации может полностью контролировать свойства гранул: режимы «зародышеобразование» и «индукция».

Карта режима роста гранул, представленная авторами в работе [5], визуализирует, когда зародышеобразование доминирует над ростом, однако она не описывает, каким именно образом контролировать их зародышеобразование. Понимание того, как равномерно распределить связующее вещество с помощью карты режима нуклеации, не только поможет контролировать распределение зародышей гранул, но и приведет к более управляемому их росту.

Разработанная расчетная модель процесса гранулирования позволит создавать и проектировать процессы с уменьшением затрат на дорогостоящую и трудоемкую экспериментальную проверку в различных масштабах работы. Оптимизация процесса в интервалах, выстроенных моделью, масштаба производства позволит вносить изменения в технологический процесс с более высокой гибкостью. Одним из критериев устойчивой модели является уменьшение неликвидных партий продуктов гранулирования, не соответствующих спецификациям.

Целью данной статьи является применение разработанной расчетной модели для оптимизации процесса гранулирования твердых лекарственных форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального подтверждения разработанной расчетной модели процесса гранулирования использовался порошок лекарственного средства, содержащий активную фармацевтическую субстанцию на основе производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана – ТСТ-9 [6], обладающую низкими фармацевтико-технологическими характеристиками [7]. Порошковую смесь лекарственного средства ТСТ-9 перед таблетированием необходимо было гранулировать. Состав вспомогательных веществ в лекарственном средстве ТСТ-9 представлен в таблице 1.

В качестве увлажнителей в экспериментальных исследованиях использовали следующие жидкости: воду очищенную (гранулирующая жидкость № 1) и 5%-й водный раствор гипромеллозы (гранулирующая жидкость № 2). Вязкость образцов измерялась с помощью вибровискозиметра SV-10 (A&D, Япония). Контактные углы смачивания на смеси порошка для гранулирования измерялись с помощью метода 1 ОФС.1.1.1.0013. Порошок гипромеллозы был предварительно подвержен просеиванию через сито с диаметром пор 180 мкм. Материал большего размера не использовался для эксперимента. В исследованиях использовалась вода очищенная, соответствующая требованиям ФС.2.2.0020 Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XV издания[1]. Поверхностное натяжение гранулирующих жидкостей измерялось на тензиометре K6 по методу отрыва кольца (метод дю Нуи) (KRÜSS GmbH, Германия).

Экспериментальное гранулирование проводилось в установке с псевдоожиженным слоем серии FBM 3-15 (QUARCO, Швейцария), оснащенной перистальтическим насосом и внутренним сменным фильтром. В исследованиях использовалась форсунка SCHLICK с регулируемым диаметром отверстия распыления (максимальное значение – 2,2 мм; минимальное – 0,5 мм).

Для определения показателей качества смеси и гранул использовались тестер сыпучести ручной с цифровым измерителем высоты EFT-01 (Electrolab, Индия) и тестер насыпной плотности ETD-1020 (Electrolab, Индия). Для оценки распределения частиц порошка и гранул по размеру использовали набор сит в соответствии с классификацией типовых размеров, представленных в ОФС.1.4.2.0032 ГФ РФ XV [11]. Показатели качества порошка для гранулирования представлены в таблице 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ГФ РФ XV впервые введена ОФС.1.1.1.0013 «Смачиваемость пористых твердых веществ» [11]. Область ее применения распространяется на этапы фармацевтической разработки, когда необходимо произвести исследования по оценке взаимодействия между жидкостями и порошками.

С применением метода 1 лежачей (неподвижной) капли, когда капля помещается на гладкую твердую поверхность порошка, формируется три интерфейса взаимодействия (жидкость – твердое тело, жидкость – пар и твердое тело – пар). Каждый из этих интерфейсов имеет поверхностную энергию или натяжение, связанное с ним, выражающееся в показателях: $\gamma^{ж/тв}$, $\gamma^{ж/пар}$ и $\gamma^{тв/пар}$.

Баланс сил определяется значением контактного угла (Θ) (или краевого угла смачивания), образующегося каплей на поверхности, с помощью уравнения Юнга:

$$\gamma^{тв/пар} = \gamma^{ж/тв} + \gamma^{ж/пар} \cdot \cos \Theta,$$

где $\gamma^{тв/пар}$ – поверхностное натяжение твердого вещества на границе с воздухом; $\gamma^{ж/тв}$ – межфазное натяжение (взаимодействие) твердого вещества с жидкостью; $\gamma^{ж/пар}$ – поверхностное натяжение жидкости на границе с воздухом; Θ – угол смачивания, или краевой угол смачивания.

Низкие значения Θ соответствуют хорошему смачиванию поверхности жидкостью. Когда $\Theta = 0$, жидкость образует пленку на твердой поверхности. Про-

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ Ссылка активна на 12.02.2025.

Таблица 1. Вспомогательные вещества в составе порошка лекарственного средства ТСТ-9

Table 1. Excipients in the composition of the powder of the medicinal product TST-9

№	Вспомогательное вещество Auxiliary substance	Нормативные документы Regulatory documents	Функция Function
1	Микрокристаллическая целлюлоза 102 Microcrystalline cellulose 102	EPh[1]	Наполнитель Filler
2	Гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромеллоза) Hydroxypropylmethylcellulose (hypromellose)	Фармакопея Евразийского экономического союза[2] и сведения справочника вспомогательных веществ, используемых при производстве лекарственных средств[3] Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union[2] and information from the directory of excipients used in the manufacture of medicines[3]	Наполнитель Filler
3	Поливинилпирролидон К-25 Polyvinylpyrrolidone K-25		Дезинтегрант Disintegrant
4	Стеарилфумарат натрия Sodium Stearyl Fumarate		Скользящее Sliding
5	Ароматизатор лимонный Lemon flavor		Модификатор вкуса Taste Modifier
6	Ароматизатор «мандарин» Tangerine flavor		Модификатор вкуса Taste Modifier
7	Сукралоза Sucralose		Модификатор вкуса Taste Modifier
8	Авицелл РН-101 Avicel PH-101		Наполнитель Filler

Примечание.

[1] Европейская фармакопея: публикуется в соответствии с Конвенцией о разработке Европейской Фармакопеи: (Серия Европейских договоров № 50). 8-е изд. М.: Ремедиум; 2015. С. 2015–2032.

[2] Решение коллегии Евразийской экономической комиссии от 25 октября 2022 года № 150 «О внесении изменений в Фармакопею Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/352073417. Ссылка активна на 12.02.2025.

[3] Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.06.2019 № 95 «О справочнике вспомогательных веществ, используемых при производстве лекарственных средствм». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_326845/92d3e3d03094ed76da5c15fa72b687f1cebd5931/ Ссылка активна на 12.02.2025.

Note.

[1] European Pharmacopoeia: published in accordance with the Convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia: (European Treaty Series No. 50). 8th ed. Moscow: Remedium; 2015. P. 2015–2032.

[2] Resolution of the Board of the Eurasian Economic Commission of October 25, 2022, No. 150 "On Amendments to the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union". Available at: https://docs.cntd.ru/document/352073417. Accessed: 12.02.2025.

[3] Decision of the Board of the Eurasian Economic Commission of June 11, 2019, No. 95 "On the directory of excipients used in the production of medicines". Available at: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_326845/92d3e3d03094ed76da5c15fa72b687f1cebd5931/ Accessed: 12.02.2025.

изведение показателей $\gamma^{ж/пар} \cdot \cos\Theta$ иными словами можно определить как адгезионное натяжение.

Гранулирующая жидкость будет самопроизвольно проникать в слой порошка только при $\Theta < 90°$; то есть при $\cos\Theta > 0$. Если $\cos\Theta < 0$, то есть $\Theta > 90°$, капля будет находиться на поверхности слоя неограниченно долго [8]. Это первый критерий эффективного проникновения капли гранулирующей жидкости.

Рассмотрим зону распыления увлажняющей жидкости и перекрытия частиц порошка каплями некоторого объема V_d в слое порошка, где эффективный размер капилляров равен R_{eff} (радиус пор), эффективная пористость (то есть доля капилляров для проникновения жидкости – открытая пористость) слоя равна E_{eff}, а время полного проникновения капли в зоне перекрытия частиц порошка увлажняющей жидкостью составляет t_p.

Для вычисления объема капли V_d гранулирующей жидкости была использована формула определения шарового сегмента сферической капли:

$$V_d = (\pi \cdot h^3)/6,$$

где V_d – объем шарового сегмента сферической капли, м^3; h – средняя высота капель, мкм.

Для слоя порошка, где пористость неоднородна и состоит из сочетания мелких капилляров и более крупных отверстий, или макропор, жидкость не будет втягиваться в макропоры за счет капиллярного всасывания [9].

Таблица 2. Фармацевтико-технологические характеристики порошка лекарственного средства ТСТ-9

Table 2. Pharmaceuticals-technological characteristics of the powder of the medicinal product TST-9

№	Показатель Indicator	Значение Meaning	Методика Methodology
1	Насыпная плотность до уплотнения, г/мл (ρ_ρ) Bulk density up to compaction, g/ml (ρ_ρ)	1,54	ГФ XV, ОФС.1.4.2.0024 «Насыпная плотность и плотность после уплотнения» SP XV GPM.1.4.2.0024 "Bulk density and density after compaction"
2	Насыпная плотность после уплотнения, г/мл (ρ_{tap}) Bulk density after compaction, g/ml (ρ_{tap})	0,93	
3	Общая пористость Total porosity	0,5	ГФ XV, ОФС.1.1.1.0008 «Определение удельной площади поверхности методом воздухопроницаемости» SP XV GPM. 1.1.1.0008 "Determination of the specific surface area by the method of breathability"
4	Удельная площадь поверхности, м^2/г (S) Specific surface area, m^2/g (S)	0,335	
5	Средний диаметр частиц порошка, мкм (d_{med}) The average diameter of the powder particles, μm (d_{med})	17,9	В приближении по величине удельной поверхности всех частиц одинакового размера и шарообразной формы оценивали средний диаметр частиц. Рассчитывали как $d_{med} = 6/S$ In the approximation of the same size and spherical shape of all particles, the average particle diameter was estimated by the magnitude of the specific surface area. We calculated how $d_{med} = 6/S$

Для такого порошкового материала используется общее понятие пористости, которое вычисляется как:

$$E_{tap} = 1 - (\rho_{tap}/\rho_\rho),$$

где E_{tap} – доля пористости, приходящаяся на макропоры, которые не способствуют всасыванию жидкости; ρ_{tap} – насыпная плотность после уплотнения, г/мл; ρ_ρ – насыпная плотность до уплотнения, г/мл.

Авторы работы [10] показали, что эффективную пористость, доступную для проникновения капли, можно оценить, учитывая только мелкие капилляры, которые способствуют капиллярному всасыванию.

Эффективную пористость можно выразить следующим образом:

$$E_{eff} = E_{tap} \cdot (1 - E + E_{tap}),$$

где E_{eff} – эффективная пористость, доступная для проникновения капли; E – общая пористость слоя (изначально значение принимается за 0,5); E_{tap} – доля пористости, приходящаяся на макропоры, которые не способствуют всасыванию жидкости.

Значение R_{eff} можно вычислить с использованием уравнения Козени – Кармана (соотношение, используемое в области гидродинамики для расчета падения давления жидкости, протекающей через уплотненный слой твердых тел) [11]:

$$R_{eff} = \frac{d_{med} \cdot E_{eff}}{3 \cdot (1 - E_{eff})},$$

где R_{eff} – эффективный радиус пор, м; d_{med} – средний диаметр по удельной площади поверхности (рассчитывается из удельной поверхности порошка, представляющей собой сумму наружных поверхностей всех частиц, имеющихся в единице его объема или массы); E_{eff} – эффективная пористость, которая учитывает реальные условия в пористом материале.

В этом случае капля увлажняющей жидкости покроет количество капилляров в слое порошка пропорционально ее проецируемой площади. Таким образом, значение времени проникновения капли увлажняющей жидкости t_p можно выразить следующим образом:

$$t_p = 1{,}35 \cdot \frac{V_d^{2/3} \cdot \eta}{R_{eff} \cdot E_{eff}^2 \cdot \gamma^{ж/пар} \cdot \cos\Theta},$$

где η – вязкость жидкости, Па · с; $\gamma^{ж/пар}$ – поверхностное натяжение жидкости на границе жидкость/пар, мН/м; Θ – краевой угол смачивания (или контактный угол) жидкости, градусы.

Важно отметить, что авторами исследования [12] была впервые выведена формула определения t_p, учитывающая основные характеристики состава лекарственного средства, которые влияют на проникновение капли (распределение размеров порошка, вязкость жидкости и адгезионное натяжение), но не позволяющая оценить вклад технологических параметров оборудования и в достаточной степени достоверно определить перспективы выхода продукта. Так как перекрытие капель в зоне распыления контролируется параметрами оборудования.

Таблица 3. Параметры расчетной модели процесса гранулирования

Table 3. Parameters of the calculation model of the granulation process

№	Параметр расчетной модели процесса Parameter of thecalculation model of the process	Обозначение Designation	СИ SI	Формула Formula	Интерпретация Interpretation
1	Объем шарового сегмента сферической капли The volume of the spherical segment of a spherical drop	V_d	м^3 m^3	$V_d = (\pi \cdot h^3)/6$	Капля увлажняющей жидкости покроет количество капилляров в слое порошка, пропорциональное объему ее шарового сегмента A drop of moisturizing liquid will cover the number of capillaries in the powder layer, in proportion to the volume of its spherical segment
2	Пористость Porosity	E_{tap}	*	$E_{tap} = 1-(\rho_{tap}/\rho_\rho)$	Характеристическое значение для порошка, где пористость неоднородна The characteristic value for a powder where the porosity is heterogeneous
3	Эффективная пористость Effective porosity	E_{eff}	*	$E_{eff} = E_{tap} \cdot (1-E+E_{tap})$	Отражает пористость, доступную для проникновения капли Reflects the porosity available for droplet penetration
4	Эффективный размер капилляров (радиус пор) Effective capillary size (pore radius)	R_{eff}	м m	$R_{eff} = \frac{d_{med} \cdot E_{eff}}{3 \cdot (1-E_{eff})}$	Уравнение Козени – Кармана – соотношение, используемое в области гидродинамики для расчета падения давления жидкости, протекающей через уплотненный слой твердых тел The Kozeni – Karman equation is a ratio used in the field of hydrodynamics to calculate the pressure drop of a liquid flowing through a compacted layer of solids
5	Время проникновения гранулирующей жидкости в смесь порошка The penetration time of the granulating liquid into the powder mixture	t_p	с s	$t_p = 1{,}35 \cdot \frac{V_d^{2/3} \cdot \eta}{R_{eff} \cdot E_{eff}^2 \cdot \gamma^{ж/пар} \cdot \cos\Theta}$	Геометрические соображения относительно поведения капли гранулирующей жидкости с учетом уравнения Лукаса – Уошберна Geometric considerations of the behavior of a droplet of a granulating liquid taking into account the Lucas – Washburn equation
6	Безразмерная величина потока распыления Dimensionless amount of spray flow	ψ	*	$\psi = \frac{3 \cdot Q_{sp}}{2 \cdot W_{sp} \cdot d_{med}}$	Произведение двух потоков – скорости формирования проекционной площади капель из сопла и скорости, с которой площадь поверхности порошка проходит через зону распыления The product of two flows – the rate of formation of the projected area of droplets from the nozzle and the rate at which the surface area of the powder passes through the spray zone

Примечание. * Параметр расчетной модели не имеет размерности величины измерения.

Note. * The calculation model parameter does not have the dimension of the measurement value.

Рассмотрим детально зону распыления, где скорость формирования проекционной площади капель из сопла составляет:

$$A_d = \frac{3 \cdot Q_{sp}}{2 \cdot d_{\text{med}}},$$

где A_d – скорость формирования проекционной площади капель гранулирующей жидкости; Q_{sp} – скорость распыления, иными словами, значение подачи объема жидкости в единицу времени (параметр, задаваемый перистальтическим насосом); d_{med} – средний диаметр капли, выходящей из сопла форсунки, соответствующий удельной поверхности.

Скорость, с которой площадь поверхности порошка проходит через зону распыления, составляет:

$$A_p = V_{sp} \cdot W_{sp},$$

где A_p – скорость, с которой площадь поверхности порошка проходит через зону распыления; V_{sp} – скорость движения порошка в зоне распыления (значение скорости заданного потока воздуха в камере с псевдоожижением); W_{sp} – ширина зоны распыления, перпендикулярная направлению потока порошка (обычно вычисляется умножением первого числа на маркировке форсунки ×5).

Произведение двух потоков V_{sp} и W_{sp} формирует безразмерный поток распыления (ψ), который выражается в виде:

$$\psi = \frac{3 \cdot Q_{sp}}{2 \cdot W_{sp} \cdot d_{\text{med}}}.$$

Таким образом, некоторая безразмерная величина (ψ) составляет основу модели влажного гранулирования и объясняет с физической точки зрения поведение порошка непосредственно в зоне распыления.

Уравнение показывает, что, когда поток распыления низкий, через зону распыления проходит большое количество порошка по сравнению с количеством генерируемых капель и каждая капля, вероятно, попадет на свободную площадь порошка. Если поток распыления высокий, капли, скорее всего, будут перекрываться с образованием слипающихся агломератов.

Параметры разработанной расчетной модели процесса гранулирования представлены в таблице 3.

Показатели расчетной модели, приведенные в таблице 3, учитывают фармацевтико-технологические характеристики состава лекарственного средства, которые влияют на проникновение капли (распределение размеров порошка, вязкость жидкости и адгезионное натяжение). Таким образом, время проникновения капли в значительной степени контролируется ее технологическими характеристиками.

Для экспериментального подтверждения разработанной расчетной модели процесса гранулирования были установлены фармацевтико-технологические характеристики состава гранулирующих жидкостей и параметры зоны распыления в установке с псевдоожиженным слоем, которые используются в вычислениях (таблицы 4 и 5).

Таблица 4. Технологические показатели гранулирующих жидкостей

Table 4. Technological parameters of granulating liquids

№	Показатель Indicator	Гранулирующая жидкость № 1 Granulating liquid No. 1	Гранулирующая жидкость № 2 Granulating liquid No. 2
1	Вязкость, Па · с Viscosity, Pa · s	10^{-3}	10^{-1}
2	Поверхностное натяжение, мН/м Surface tension, mN/m	70	43
3	Средняя высота сферической капли, мкм* The average height of a spherical drop, μm*	100	250
4	Величина контактного угла (Θ), градусы** The value of the contact angle (Θ), degrees**	50	30
5	Объем, мл Volume, ml	600	600**

Примечание. * На основании данных компании Spraying Systems Co.

** Величина контактного угла была установлена по отношению к смеси для гранулирования, состоящей из микрокристаллической целлюлозы и гипромеллозы в пропорции 1 : 1.

*** По завершении этапа распыления для промывки шлангов и форсунки использовалось 50 мл воды очищенной.

Note. * Based on data from Spraying Systems Co.

** The contact angle value was determined using a granulation mixture consisting of microcrystalline cellulose and hypromellose in a 1:1 ratio.

*** After the spraying stage, 50 ml of purified water was used to flush the hoses and nozzle.

Установленные значения были использованы для вычисления параметров расчетной модели гранулирования. Результаты представлены в таблице 6.

На основании расчетных показателей модели нуклеации и результатов гранулирования замена воды очищенной на более вязкий раствор гипромеллозы имела следующие последствия.

- ✓ Увеличение времени проникновения: более высокая вязкость суспензии гипромеллозы увеличила время проникновения. Это означает, что жидкость впитывалась в слой порошка медленнее, а задерживалась на поверхности дольше, что подтверждается высоким значением показателя влажности гранул на выходе.
- ✓ При использовании раствора гипромеллозы время проникновения капель значительно увеличивается, а поток распыления снижается по сравнению с теми же параметрами при применениии воды очищенной. В результате это привело к тому, что система гранулирования вышла из режима, контролируемого потоком увлажняющей жидкости, что повлекло за собой ухудшение равномерности гранулирования.

Таблица 5. Технологические параметры зоны распыления и сушки гранул

Table 5. Technological parameters of the pellet spraying and drying zone

№	Параметр процесса Process Parameter	Единицы измерения Units of measurement	Значение Meaning
1	Скорость движения порошка в зоне распыления The speed of movement of the powder in the spray area	м/с m/s	0,82
2	Ширина зоны распыления Width of the spray area	м m	0,076
3	Скорость распыления Spray rate	мл/мин ml/min	45
		$м^3/с$ m^3/s	$7,5 \cdot 10^{-7}$
4	Температура в камере на этапе распыления The temperature in the chamber at the spraying stage	°C	30–35
5	Температура в камере на этапе сушки гранул Temperature in the chamber at the granule drying stage	°C	40
6	Атомизация форсунки The temperature in the chamber at the stage of drying granules	Бар Bar	2,0–2,2
7	Режим распыления Spray mode	–	Верхний Upper

Таблица 6. Результаты процесса гранулирования

Table 6. Results of the granulation process

№	Параметр расчетной модели процесса Parameter of the calculation model of the process	Единицы измерения Units of measurement	Результаты вычисления Calculation results
1	Объем шарового сегмента сферической капли The volume of the spherical segment of a spherical drop	$м^3$ m^3	$5,2 \cdot 10^{-13}$
2	Пористость Porosity	*	0,4
3	Эффективная пористость Effective porosity	*	0,36
4	Эффективный размер капилляров (радиус пор) Effective capillary size (pore radius)	м m	$3,36 \cdot 10^{-6}$
5	Время проникновения гранулирующей жидкости № 1 в смесь порошка The penetration time of the granulating liquid No. 1 in the powder mixture	с s	$4,46 \cdot 10^{-7}$
	Время проникновения гранулирующей жидкости № 2 в смесь порошка The penetration time of granulating liquid No. 2 into the powder mixture		0,55
6	Безразмерная величина потока распыления для гранулирующей жидкости № 1 Dimensionless amount of spray flow for granulating liquid No. 1	*	0,18
	Безразмерная величина потока распыления для гранулирующей жидкости № 2 Dimensionless size of the spray flow of granulating liquid No. 2		0,07

Примечание. * Параметр расчетной модели процесса не имеет размерности величины измерения.

Note. * The parameter of the process calculation model does not have the dimension of the measurement value.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были впервые продемонстрированы результаты разработки и применения расчетной модели для оптимизации процесса гранулирования твердых лекарственных форм на примере системы влажного гранулирования в псевдоожиженном слое порошка лекарственного средства ТСТ-9, содержащего активную фармацевтическую субстанцию на основе производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана.

Впервые представлен алгоритм вычисления параметров расчетной модели – пористости, эффективной пористости, эффективного размера капилляров (радиуса пор) порошка, времени проникновения капли, которое контролируется фармацевтико-технологическими характеристиками состава лекарственного средства, и безразмерного потока распыления, который регулируется технологическими параметрами процесса.

Установленные значения позволили осуществить прогноз поведения гранул. Полученные проектируемые значения расчетной модели имели подтверждение в экспериментальных исследованиях гранулирования в установке с псевдоожиженным слоем с применением различных увлажняющих жидкостей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Iveson S. M., Litster J. D. Growth regime map for liquid-bound granules. *AIChE Journal*. 1998;44(7):1510–1518.
2. Iveson S. M., Litster J. D., Ennis B. J. Fundamental studies of granule consolidation Part 1: Effects of binder content and binder viscosity. *Powder Technology*. 1996;88(1):15–20.
3. Becher R. D., Schlünder E. U. Fluidized bed granulation: gas flow, particle motion and moisture distribution. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 1997;36(4):261–269.
4. Hapgood K. P., Litster J. D., Biggs S. R., Howes T. Drop penetration into porous powder beds. *Journal of colloid and interface science*. 2002;253(2):353–366.
5. Hapgood K. P., Litster J. D., Smith R. Nucleation regime map for liquid bound granules. *AIChE Journal*. 2003;49(2):350–361.
6. Lavrov M. I., Karlov D. S., Palyulin V. A., Grigoriev V. V., Zamoyski V. L., Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Zapolskiy M. E. Novel positive allosteric modulator of AMPA-receptors based on tricyclic scaffold. Mendeleev Communications. 2018;28(3):311–313. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.05.028.
7. Бркич Г. Э., Пятигорская Н. В., Зырянов О. А., Дёмина Н. Б., Бахрушина Е. О., Краснюк И. И. Технологические аспекты создания лекарственной формы оригинальной субстанции 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):44–52. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-44-52. [Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Zyryanov O. A., Demina N. B., Bakhrushina E. O., Krasnyuk I. I. Technologic Considerations of Creation Dosage Form of Original Substance 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane. *Drug development & registration*. 2020;9(4):44–52. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-44-52.]
8. Alghunaim A., Kirdponpattara S., Newby B. Z. Techniques for determining contact angle and wettability of powders. *Powder Technology*. 2016;287:201–215. DOI: 10.1016/j.powtec.2015.10.002.
9. Guo W., Hansson J., van der Wijngaart W. Capillary pumping independent of liquid sample viscosity. *Langmuir*. 2016;32(48):12650–12655. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03488.
10. Litster J. Wet Granulation. Design and Processing of Particulate Products. In: Design and Processing of Particulate Products. Cambridge: Cambridge University Press; 2016. P. 228–272. DOI: 10.1017/cbo9781139017558.
11. Liu M., Wu J., Gan Y., Hanaor D. A. H., Chen C. Q. Evaporation Limited Radial Capillary Penetration in Porous Media. *Langmuir*. 2016;32(38):9899–9904. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02404.
12. Lucas R. Ueber das Zeitgesetz des kapillaren Aufstiegs von Flüssigkeiten. *Kolloid-Zeitschrift*. 1918;23(1):15–22. DOI: 10.1007/bf01461107.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.071

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2006

Check for updates

CC BY 4.0

Оценка подлинности синюхи голубой травы (*Polemonium caeruleum herba*) по анатомическим признакам

А. С. Чистякова, А. С. Болгов, А. А. Гудкова✉, Г. Ю. Шестакова, А. И. Сливкин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»). 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Гудкова Алевтина Алексеевна. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: А. С. Чистякова – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904;
А. С. Болгов – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953;
А. А. Гудкова – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000;
Г. Ю. Шестакова – https://orcid.org/0000-0003-1256-4949;
А. И. Сливкин – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Статья поступила: 23.12.2024 **Статья принята в печать:** 08.12.2025 **Статья опубликована:** 12.12.2025

Резюме

Введение. Синюха голубая является единственным представителем семейства синюховых, который допустим к использованию в медицинской практике. Синюхи голубой корневища с корнями применяются в качестве отхаркивающего и седативного средства и включены в Государственную фармакопею XIV изд. Трава растения используется в качестве биологически активной добавки седативного действия, однако нормативная документация на данный вид сырья до настоящего времени не разработана.

Цель. Описание анатомических признаков, необходимых при разработке проекта фармакопейной статьи для формирования раздела «Микроскопия» и оценки подлинности растительного сырья «Синюхи голубой трава».

Материалы и методы. В работе использовались несколько образцов синюхи голубой травы, которые были собраны самостоятельно от культивируемых растений (*Polemonium caeruleum* L.) в 2022 и 2023 гг. в период массового цветения на территории Ботанического сада им. Б. М. Козо-Полянского ФГБОУ ВО ВГУ (Воронеж). Микроскопический анализ выполняли в соответствии с требованиями действующей нормативной документации.

Результаты и обсуждение. Установлено, что эпидермальные клетки листа, чашечки и венчика синюхи голубой извилистые, на цветоносах – вытянутые. Трихомы двух типов. По краю листа и на чашелистиках находятся сосочковидные выросты эпидермиса. Мезофилл снизу листа представлен губчатой тканью. Проводящая система преимущественно спирального типа утолщения. Устьица аномоцитного типа. Стебель округлый или со слабо выраженными гранями. Первичная кора стебля представлена колленхимой, запасающей паренхимой без включений, эндодермой с поясками Каспари. Стела беспучкового строения. Камбий состоит из сплошных рядов мелких клеток. Флоэма представлена мелкими клетками. Во вторичной ксилеме отсутствуют сердцевидные лучи, радиально расположенные сосуды имеют толстые стенки. Сердцевина представлена клетками паренхимы с каплями масла. Черешок в очертании треугольный, с глубокой выемкой сверху и длинными краевыми выростами, где находится по одному мелкому проводящему пучку. Центральный пучок в форме дуги с загнутыми вовнутрь краями с паренхимной обкладкой.

Заключение. В рамках настоящего исследования с помощью различных приемов микроскопического анализа изучены анатомо-диагностические признаки синюхи голубой травы. Полученные данные будут использованы при разработке проекта фармакопейной статьи «Синюхи голубой трава», а именно для формирования раздела «Микроскопия».

Ключевые слова: микроскопический анализ, синюхи голубой трава

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

Вклад авторов. А. А. Гудкова и А. И. Сливкин отвечали за построение эксперимента, участвовали в решении организационных вопросов, осуществляли постановку целей и задач исследования. Г. Ю. Шестакова отвечала за культивирование синюхи голубой и совместно с А. С. Чистяковой заготавливала объекты исследования, высушивала и приводила их в стандартное состояние. А. С. Болгов выполнял пробоподготовку и совместно с А. С. Чистяковой и А. А. Гудковой проводил основную часть эксперимента. А. С. Болгов выполнил английский перевод. Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

© Чистякова А. С., Болгов А. С., Гудкова А. А., Шестакова Г. Ю., Сливкин А. И., 2026
© Chistyakova A. S., Bolgov A. S., Gudkova A. A., Shestakova G. Yu., Slivkin A. I., 2026

Для цитирования: Чистякова А. С., Болгов А. С., Гудкова А. А., Шестакова Г. Ю., Сливкин А. И. Оценка подлинности синюхи голубой травы (*Polemonium caeruleum herba*) по анатомическим признакам. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):106–114. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2006

Assessment of the authenticity of Jacob's ladder herb (*Polemonium caeruleum herba*) by anatomical characteristics

Anna S. Chistyakova, Alexey S. Bolgov, Alevtina A. Gudkova✉, Galina Yu. Shestakova, Alexey I. Slivkin

Voronezh State University. 1, Universitetskaya ploshchad, Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Alevtina A. Gudkova. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: Anna S. Chistyakova – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904;
Alexey S. Bolgov – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953;
Alevtina A. Gudkova – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000;
Galina Yu. Shestakova – https://orcid.org/0000-0003-1256-4949;
Alexey I. Slivkin – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Received: 23.12.2024 **Accepted:** 08.12.2025 **Published:** 12.12.2025

Abstract

Introduction. Blue Polemonium (*Polemonium caeruleum* L.) is the only representative of the Lilac family, which is allowed for use in medical practice. Blue polemonium rhizomes with roots are used as an expectorant and sedative and are included in the State Pharmacopoeia XIV edition. The herb of the plant is used as a biologically active additive of sedative action, however, regulatory documentation for this type of raw material has not been developed so far.

Aim. Description of anatomical features required in the development of draft pharmacopoeial article for the formation of the section "Microscopy" and assessing the authenticity of plant raw materials "*Polemonium caeruleum herba*".

Materials and methods. Several samples of blue polemonium, which were collected independently from cultivated plants (*Polemonium caeruleum* L.) in 2022 and 2023 during the period of mass flowering on the territory of the Botanical Garden named after B. M. Kozo-Polyansky VSU (Voronezh), were used in this work. Microscopic analysis was performed in accordance with the requirements of the current regulatory documentation.

Results and discussion. It was found that epidermal cells of leaf, calyx and corolla of blue polemonium are twisted, elongated on peduncles. Trichomes are of two types. There are papillae-like outgrowths of epidermis along the leaf margin and on sepals. Mesophyll is represented by spongy tissue. The conducting system is predominantly of spiral thickening type. Stomata are of anomocytic type. Stem is rounded or with weakly expressed edges. Primary cortex of the stem is represented by collenchyma, storage parenchyma without inclusions, endoderm with Caspari girdles. The stem is of tubeless structure. Cambium consists of continuous rows of small cells. Phloem is represented by small cells, sieve tubes with satellite cells. Secondary xylem lacks heart-shaped rays, radially arranged vessels have thick walls. The medulla is represented by parenchyma cells with oil droplets. The petiole is triangular in outline with a deep notch at the top and long marginal outgrowths, where there is one small conducting bundle each. The central bundle is arc-shaped with inwardly curved edges with parenchyma lining.

Conclusion. In the framework of the present study, anatomo-diagnostic features of blue polemonium herb were studied with the help of various methods of microscopic analysis. The obtained data will be used in the development of the draft pharmacopoeial article "*Polemonium caeruleum herb*", namely for the formation of the section "Microscopy".

Keywords: microscopic analysis, *Polemonium caeruleum* herba

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. Alevtina A. Gudkova and Alexey I. Slivkin were responsible for the construction of the experiment, participated in solving organizational issues, and carried out the setting of goals and objectives of the study. Galina Yu. Shestakova was responsible for the cultivation of blue polemonium, and together with Anna S. Chistyakova prepared the research objects, dried and brought them to a standardized state. Alexey S. Bolgov performed sample preparation and together with Anna S. Chistyakova and Alevtina A. Gudkova carried out the main part of the experiment. Alexey S. Bolgov performed the English translation. All authors participated in the discussion of the results obtained in the format of scientific discussion.

For citation: Chistyakova A. S., Bolgov A. S., Gudkova A. A., Shestakova G. Yu., Slivkin A. I. Assessment of the authenticity of Jacob's ladder herb (*Polemonium caeruleum herba*) by anatomical characteristics. *Drug development & registration.* 2026;15(1):106–114. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2006

ВВЕДЕНИЕ

Семейство синюховых (*Polemoniaceae* Juss.), по данным сайта World flora online[1], известно с 1789 года, входит в основную группу покрытосемянных растений и насчитывает 27 родов. В медицинской практике используется один род – синюха (полемониум) (*Polemonium* L.), включающий 41 подчиненный таксон, из которых нашел применение лишь один, синюха голубая (*Polemonium caeruleum* L.). Растение изначально было рекомендовано М. Н. Варлаковым в 1932 году как заменитель импортируемой и дорогостоящей сенеги, и до настоящего времени корневища с корнями синюхи голубой используются в качестве отхаркивающего средства и включены в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV изд.[2] [1, 2]. Кроме того, являющаяся ранее отходом при заготовке подземных органов трава синюхи голубой также активно привлекает внимание ученых и используется в виде биологически активной добавки к пище, проявляющей седативное действие[3] [3–5]. Помимо седативной активности, для травы синюхи голубой установлено гипогликемическое [6], иммуностимулирующее действие [7], положительное влияние на сердечно-сосудистую систему [8] и др. [9]. Углубленное изучение химического состава синюхи голубой показало, что комплекс биологически активных веществ травы растения в некой мере схож с комплексом подземных органов и представлен тритерпеновыми сапонинами [10], флавоноидами, дубильными веществами, различными группами полисахаридов, органическими и аминокислотами [2, 10–12], а также макро- и микроэлементами [2]. Однако, несмотря на интерес к данному виду растительного сырья, на синюхи голубой траву до сих пор не разработана нормативная документация и отсутствуют рекомендации касательно ее стандартизации. Начальным этапом в данном направлении является определение требований к подлинности растительного сырья, что устанавливается посредством проведения макро- и микроскопического анализа [13–15]. В более ранних работах нами были описаны морфологические признаки растительного сырья синюхи голубой травы [16, 17]. Следующим этапом при разработке критериев подлинности растительного сырья является описание его микродиагностических признаков.

Целью исследования являлось описание анатомических признаков, необходимых при разработке проекта фармакопейной статьи для формирования раздела «Микроскопия» и оценки подлинности растительного сырья «Синюхи голубой трава».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались несколько образцов синюхи голубой травы, которые были собраны самостоятельно от культивируемых растений (*Polemonium caeruleum* L.) в 2022 и 2023 гг. в период массового цветения на территории Ботанического сада им. Б. М. Козо-Полянского ФГБОУ ВО ВГУ (Воронеж). Микроскопический анализ выполняли в соответствии с требованиями действующей нормативной документации[4]. Анатомические признаки изучали после кипячения объектов в 2,5%-м водном растворе натрия гидроксида (АО «ВЕКТОН», Россия) на препаратах с поверхности. При изучении строения стеблей и черешков листьев синюхи голубой объекты предварительно помещали в раствор состава спирт этиловый 95%-й : глицерин : вода очищенная в соотношении 1 : 1 : 1, для окрашивания лигнифицированных элементов применяли смесь, состоящую из 1%-го раствора флороглюцина и 25%-го раствора серной кислоты. Анализ проводили с использованием микроскопа «Микромед-3 Люм» (×40, ×100, ×400) (Россия). Микрофотографии выполняли с помощью видеокамеры Levenhuk C310 NG (КНР), обработка полученных снимков производилась в программе ToupView (x86).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках проведения микроскопического анализа были визуализированы и описаны анатомические признаки синюхи голубой травы и установлены их биометрические характеристики (таблица 1).

При анализе анатомических особенностей (на препарате листа с поверхности) синюхи голубой листа установлено, что верхние эпидермальные клетки преимущественно полигональной формы, со слегка заметной извилистостью стенок, в то время как снизу листа клетки различной формы, вытянутые, клеточные стенки сильно извилистые. Трихомы нескольких типов. Преимущественно снизу по жилкам у молодых листьев и по краю листа видны железистые трихомы с многоклеточной ножкой (до 7 клеток) и головкой из одной или нескольких клеток (2–4 клетки). Схожие по строению трихомы встречаются по жилкам и на черешках старых листьев (рисунок 1).

[1] World flora online. Available at: https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000484167#children. Accessed: 30.11.2024.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. ФС.2.5.0039.15 «Синюхи голубой корневища с корнями *Polemonii caerulei rhizomata cum radicibus*». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-5/sinyukhi-goluboy-kornevishcha-s-kornyami-polemonii-caerulei-rhizomata-cum-radicibus/ Ссылка активна на 23.02.202.

[3] Справочник Видаль. Доступно по: https://www.vidal.ru/drugs/valemidin-plus. Ссылка активна на 30.11.2024.

[4] Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-5/1-5-1/mikroskopicheskiy-i-mikrokhimicheskiy-analiz-lekarstvennogo-rastitelnogo-syrya-i-lekarstvennykh-sred/ Ссылка активна на 22.11.2024.

Край как молодых, так и старых листьев имеет несколько рядов сосочковидных выростов эпидермиса. Клетки эпидермиса (около двух рядов), располагающиеся вдоль края листа, прямоугольной формы. Мезофилл нижней стороны листа синюхи голубой представлен губчатой тканью с округлыми воздухоносными полостями и овальными клетками (см. рисунок 1). Также встречаются простые трихомы с 2–9 клетками, которые имеют расширенное основание и перекрученные клетки (см. рисунок 1). Многочисленные устьица широкоовальной формы, расположены преимущественно снизу листа и имеют аномоцитный тип строения, на верхней стороне листа устьица встречаются редко. Проводящая система преимущественно спирального типа утолщения.

Таблица 1. Биометрические характеристики основных анатомических признаков листа синюхи *Polemonium caeruleum*

Table 1. Biometric characteristics of the main anatomical features of the leaf of *Polemonium caeruleum*

Диагностический признак Diagnostic feature	Характеристика Characteristic
Клетки верхнего эпидермиса листа (d × l), мкм	42,8–93,2 × 14,23–34,95
Клетки нижнего эпидермиса листа (d × l), мкм	71,02–104,93 × 14,6–40,84
Устьица на нижней стороне листа (d × l), мкм	28,79–36,83 × 23,3–29,04
Частота встречаемости устьиц на нижней стороне листа (на 1 мм^2), шт.	10,9 ± 6,5
Простые трихомы по жилкам на нижней стороне листа (d × l), мкм	73,4–426,75 × 13,98–70,30
Частота встречаемости простых трихом по жилкам на нижней стороне листа (на 1 мм^2), шт.	0,31 ± 0,15
Железистые трихомы на листе (d × l), мкм	302,9 × 13,98
Частота встречаемости железистых трихом на нижней стороне листа (на 1 мм^2), шт.	4,58 ± 1,28
Клетки эпидермиса чашелистика (d × l), мкм	88,60–142,76 × 31,50–59,82
Клетки эпидермиса лепестка венчика (d × l), мкм	73,50–74,56 × 13,93–18,41
Одноклеточные трихомы на чашелистике (d × l), мкм	1,77–58,78 × 0,4–10,32
Частота встречаемости одноклеточных трихом на чашелистике (на 1 мм^2), шт.	29,87 ± 12,45
Железистые трихомы на чашелистике (d × l), мкм	16,01–354,16 × 8,0–8,05
Частота встречаемости железистых трихом на чашелистике (на 1 мм^2), шт.	1,24 ± 0,56
Трихомы на поверхности лепестка венчика (d × l), мкм	10,12–38,65 × 8,38–16,31
Частота встречаемости трихом на поверхности лепестка венчика (на 1 мм^2), шт.	4,58 ± 1,27

При оценке анатомических особенностей элементов цветка выявлено, что на чашелистиках синюхи голубой клетки эпидермиса вытянутой формы (рисунок 2). На поверхности чашелистиков располагаются сосочковидные выросты, чередующиеся с многочисленными железистыми трихомами. Трихомы прикрепляются посредством многоклеточной ножки (от 2 до 7 клеток) и имеют головку из выделительных клеток (от 2 до 4). Подобные трихомы лучше всего видны по краю чашелистика (наибольшее их количество), но встречаются по всей его поверхности.

Эпидермис лепестков венчика имеет сильно извилистые клетки эпидермиса с заметными утолщениями стенок (рисунок 3). На поверхности лепестков венчика встречаются простые многоклеточные волоски (1–5-клеточные) конической формы. При обламывании трихом остаются места их прикрепления в виде овального образования. Устьица как на чашелистиках, так и лепестках венчика встречаются редко, аномоцитного типа.

Для изучения анатомических особенностей цветоносов синюхи голубой готовили «давленые препараты» (рисунок 4). Клетки эпидермиса цветоносов прямоугольной формы, вытянутые, с извилистыми стенками. Вся поверхность цветоноса синюхи голубой обильно усеяна трихомами. Простые трихомы могут быть одно-, дву- и многоклеточные, клеточные стенки тонкие, верхушка туповатая. Железистые трихомы имеют многоклеточную ножку (3–5 клеток) с округлой головкой (2–4 клетки), которая часто обламывается. Редкие устьица аномоцитного типа. Проводящая система представлена преимущественно сосудами со спиральным типом утолщения.

Все вышеописанные признаки сохраняют свое значение для цельного, измельченного и порошкованного сырья (рисунок 5).

Учитывая, что в составе цельной травы синюхи голубой встречается определенный процент стеблей и черешков, а наиболее точную информацию о строении данных объектов возможно получить анализируя поперечные срезы, для более глубокой оценки анатомических признаков синюхи голубой выполняли поперечные срезы стебля и черешка. Пробоподготовка в данном случае заключалась в выдерживании объектов исследования в растворе состава спирт этиловый 95%-й : глицерин : вода очищенная (1 : 1 : 1).

Согласно исследованию (рисунок 6), медиальная часть стебля имеет округлую форму, в то время как центральная часть имеет округлую форму со слабо заметными гранями, а на срезе через базальную часть грани отчетливо заметны. Эпидермальные клетки стебля имеют вытянутую форму, клеточные стенки – прямые антиклинальные. Устьица стебля синюхи голубой аномоцитного типа. Установлено, что первичная кора стебля синюхи голубой представлена несколькими рядами колленхимы (2–3 слоя клеток), запасающей паренхимы (до 8 слоев) без каких-либо включений, отчетливо заметной эндодермой с поясками Каспари, количество слоев вышеперечисленных тканей увеличивается в реберных дугах.

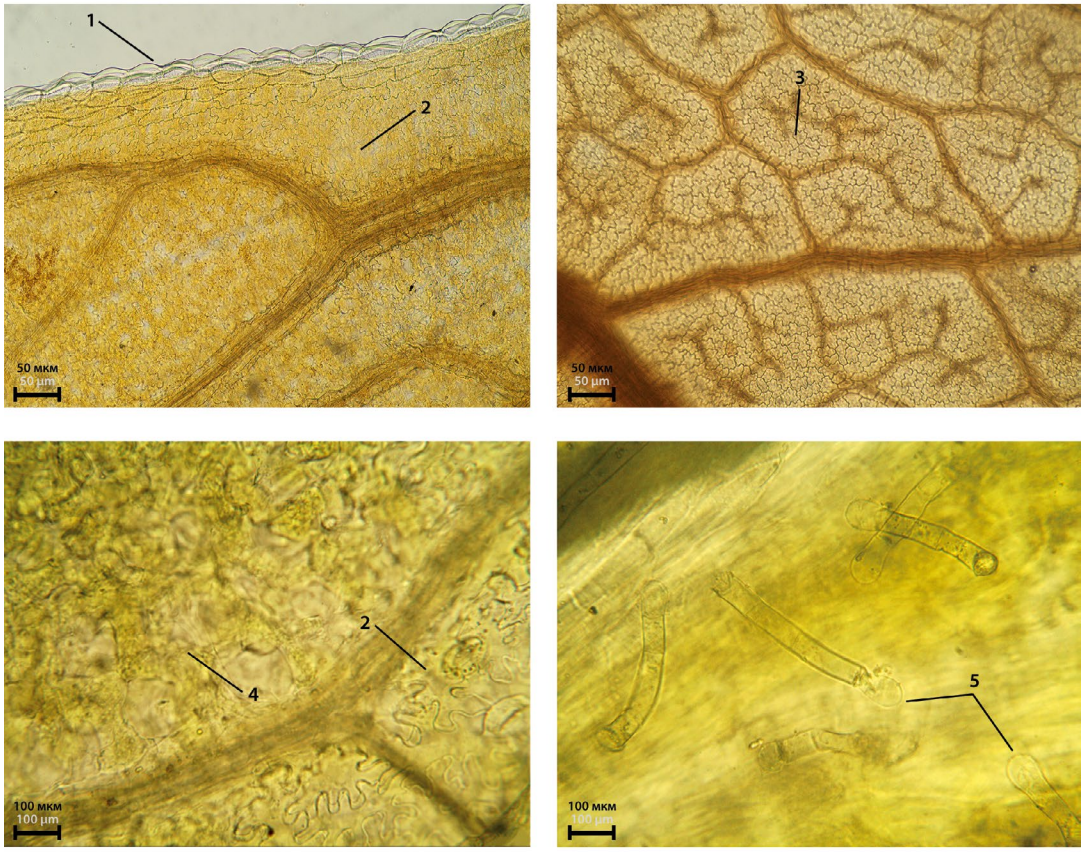
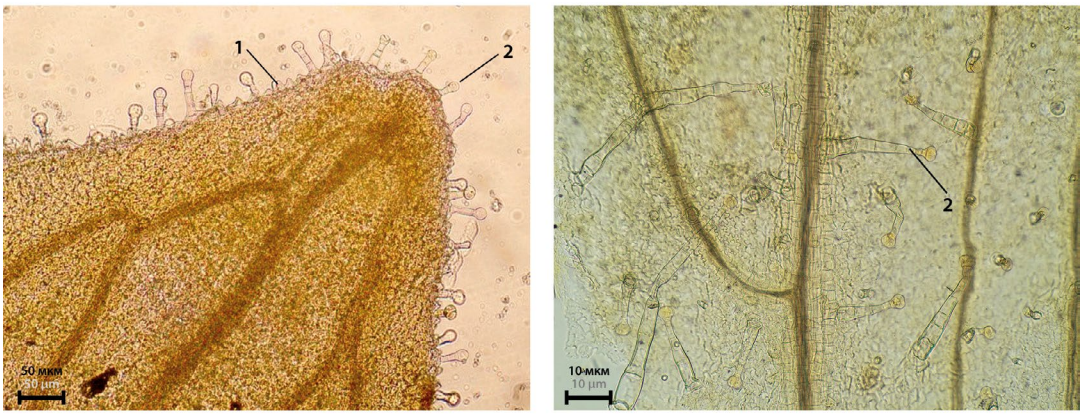


Рисунок 1. **Фрагмент листа *Polemonium caeruleum*:**

1 – край листа с сосочковидными выростами эпидермиса; 2 – клетки нижней стороны листа (×100); 3 – клетки верхней стороны листа (×100); 4 – губчатая ткань мезофилла нижней стороны листа (×400); 5 – железистые трихомы трихомы по жилке базальной части листа (×400)

Figure 1. **Fragment of a leaf of *Polemonium caeruleum*:**

1 – leaf edge with papillary outgrowths of the epidermis; 2 – cells of the lower side of the leaf (×100); 3 – cells of the upper side of the leaf (×100); 4 – spongy tissue of the mesophyll of the lower side of the leaf (×400); 5 – glandular trichomes trichomes along the vein of the basal part of the leaf (×400)



А
A

Б
B

Рисунок 2. **Фрагменты чашелистика *Polemonium caeruleum*:**

1 – сосочковидные выросты; 2 – железистые трихомы (А – ув. ×100; Б – ув. ×400)

Figure 2. **Fragment of the petal of the calyx of *Polemonium caeruleum*:**

1 – papillae-like outgrowths, 2 – glandular trichomes (A – ×100; Б – ×400)

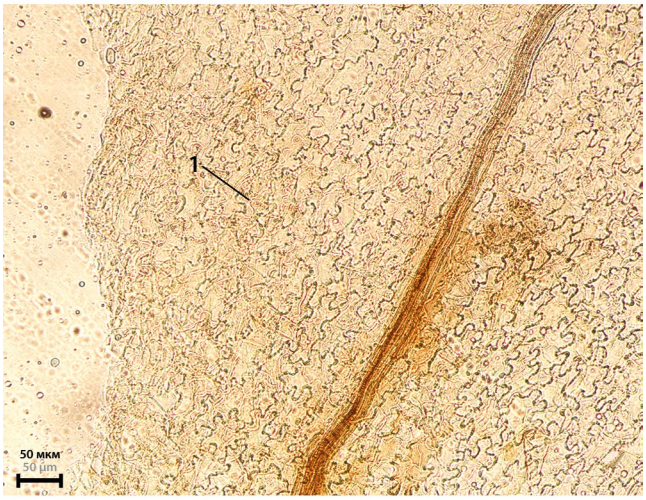


Рисунок 3. Фрагмент лепестка венчика *Polemonium caeruleum*:
1 – извилистые клетки (×100)

Figure 3. Fragment of the corolla petal of *Polemonium caeruleum*:
1 – tortuous cells (×100)

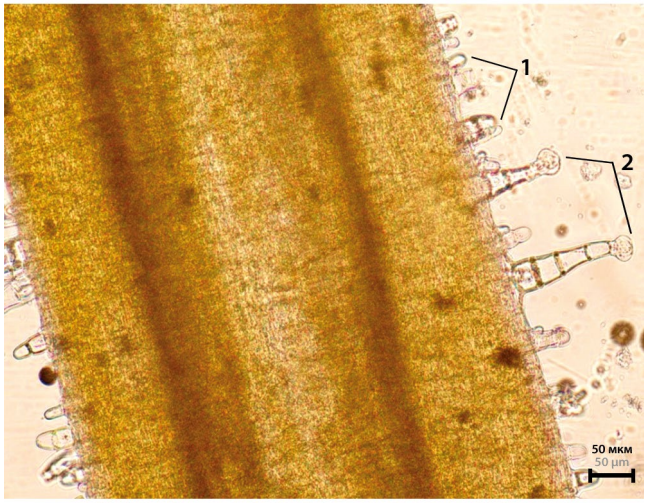


Рисунок 4. Фрагмент цветоноса *Polemonium caeruleum*:
1 – одно- и многоклеточные простые трихомы; 2 – железистые трихомы, ×100

Figure 4. Fragment of peduncle of *Polemonium caeruleum*:
1 – uni- and multicellular simple trichomes; 2 – glandular trichomes, ×100

Большую часть стебля синюхи голубой занимает стела беспучкового строения, сформированная из 8–9 отчетливо заметных в первичной ксилеме сросшихся коллатеральных пучков открытого типа. В первичной ксилеме встречаются немногочисленные группы неодревесневших сосудов. Некоторые участки вторичной ксилемы сливаются с флоэмой. В стеле отсутствует перециклическая ксилема, вместо нее визуализируется кольцо вторичной ксилемы. Камбий состоит из нескольких сплошных рядов мелких клеток (1–2 ряда). Флоэма стебля синюхи голубой представлена мелкими клетками. Во вторичной ксилеме отсутствуют сердцевидные лучи, сосуды имеют толстые стенки и расположены радиально.

Сердцевина представлена клетками паренхимы, которые увеличиваются в своих размерах к центру. Сердцевина стебля синюхи голубой может разрушаться со временем, в результате чего в центре образуется полость.

В результате изучения поперечного среза черешка синюхи голубой (петиолярная анатомия) показано, что форма черешка в очертании треугольная, с глубокой выемкой в верхней части и длинными краевыми выростами, в которых визуализируется по одному мелкому проводящему пучку. В центре черешка расположен один проводящий пучок в форме дуги с загнутыми вовнутрь краями, имеющий паренхимную обкладку. Эпидермис черешка синюхи голубой

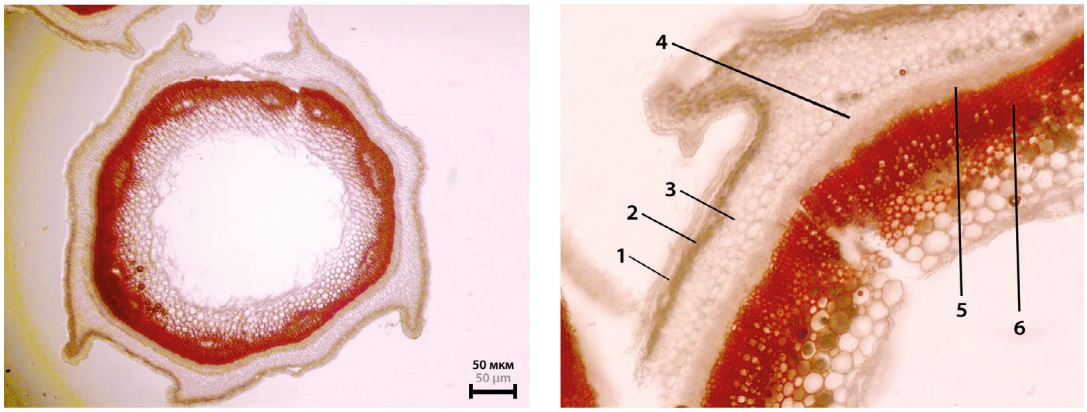


А
A

Б
B

Рисунок 5. Вид порошка (А) и измельченной травы (Б) *Polemonium caeruleum* (×40)

Figure 5. Powder (A) and crushed herb (B) of *Polemonium caeruleum* (×40)



А
A

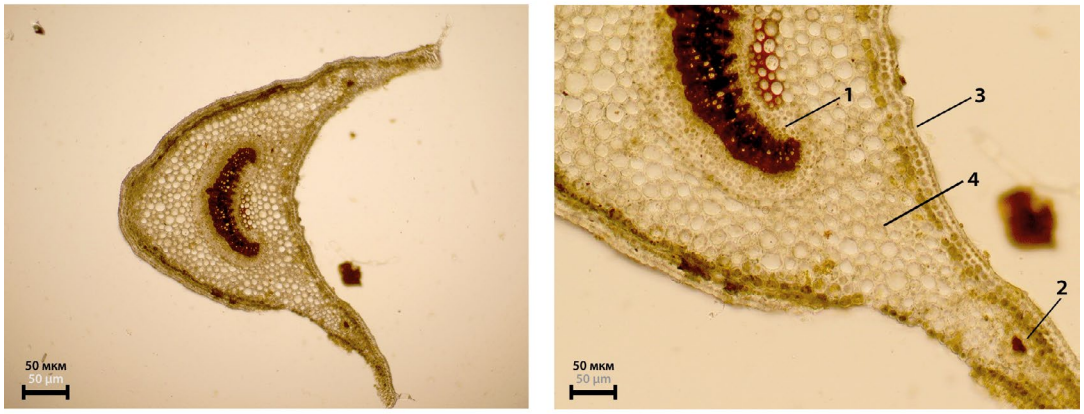
Б
B

Рисунок 6. **Поперечный срез стебля *Polemonium caeruleum*:**

1 – клетки эпидермиса; 2 – колленхима; 3 – клетки паренхимы коры; 4 – эндодерма; 5 – флоэма; 6 – ксилема (А – ув. ×100; Б – ув. ×400)

Figure 6. **Stem of *Polemonium caeruleum* (transverse section):**

1 – epidermis cells; 2 – collenchyma; 3 – cortical parenchyma cells; 4 – endoderm; 5 – phloem; 6 – xylem (A – ×100; B – ×400)



А
A

Б
B

Рисунок 7. **Черешок листа *Polemonium caeruleum*:**

1 – центральный проводящий пучок; 2 – боковой проводящий пучок; 3 – эпидермис; 4 – клетки паренхимы (А – ув. ×100; Б, В – ув. ×400)

Figure 7. **Leaf petiole of *Polemonium caeruleum*:**

1 – central conducting bundle; 2 – lateral conducting bundle; 3 – epidermis; 4 – parenchyma cells (A – ×100; B – ×400)

имеет строение, схожее со строением стебля, исключение составляет неотчетливо выраженная колленхима (рисунок 7).

Таким образом, был проведен микроскопический анализ синюхи голубой травы, в результате чего были выявлены, визуализированы и описаны основные анатомо-диагностические признаки, позволяющие достоверно идентифицировать объект настоящих исследований как в цельном, так и в измельченном и порошкованном виде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследования с помощью различных приемов микроскопического анализа изучены анатомо-диагностические признаки растительного сырья синюхи голубой травы. Полученные данные будут использованы при разработке проекта фармакопейной статьи для формирования раздела «Микроскопия» и оценки подлинности растительного сырья «Синюхи голубой трава».

ЛИТЕРАТУРА

1. Атавуллаева Ш., Кароматов И. Д. Лекарственное растение синюха Лазурная. *Биология и интегративная медицина*. 2018;5(22):67–71.
2. Мальцева А. А., Сорокина А. А., Брежнева Т. А., Чистякова А. С., Сливкин А. И. Трава синюхи голубой – перспективный источник тритерпеновых сапонинов. *Фармация*. 2011;7:13–16.
3. Хожаенко Е. В., Пак П. А., Шокур О. А., Кондратьева Г. К., Подкорытова Е. А. Разработка комплексного фитопрепарата на основе синюхи голубой, зверобоя продырявленного, астрагала перепончатого. *Традиционная медицина*. 2022;3(69):47–51. DOI: 10.54296/18186173_2022_3_47.
4. Гудкова А. А., Бузлама А. В., Чистякова А. С., Болгов А. С., Кузнецов А. Ю., Алексеенко Е. А., Сливкин А. И. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», правопреемник. Способ коррекции постпрандиальной гликемии. Патент РФ на изобретение № 2805492. 17.10.2023.
5. Łaska G., Sieniawska E., Świątek Ł., Zjawiony J., Khan S., Boguszewska A., Stocki M., Angielczyk M., Polz-Dacewicz M. Phytochemistry and biological activities of *Polemonium caeruleum* L. *Phytochemistry Letters*. 2019;30:314–323. DOI: 10.1016/j.phytol.2019.02.017.
6. Evseenko V. A., Gudymo A. S., Danilchenko N. V., Onkhonova G. S., Vu L. T., Ryzhikov A. B. Saponins extracted from *Polemonium caeruleum* have adjuvant activity in guinea pig intranasal immunization with trivalent influenza antigens. *Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research*. 2020;3:1–5. DOI: 10.15761/FDCCR.1000142.
7. Melikov F. M. Phytotherapy of psychogenic cardiovascular diseases. *Bulletin of the state Nikita botanical gardens*. 2015;114:34–38.
8. Хишова О. М., Щербинин И. Ю., Дубашинская Н. В. Седативное действие комбинации порошков корневищ с корнями синюхи голубой и валерианы лекарственной. *Фармация*. 2013;1:43–44.
9. Фади Х., Потанина О. Г., Абрамович Р. А. Преимущества выбора состава комбинированного растительного лекарственного средства седативного действия. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022;25(6):46–50. DOI: 10.29296/25877313-2022-06-06.
10. Шестакова Г. Ю., Гудкова А. А., Чистякова А. С., Агафонов В. А. Органические кислоты синюхи голубой. Бюллетень Государственного *Никитского ботанического сада*. 2021;138:85–91. DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-85-91.
11. Гудкова А. А., Шестакова Г. Ю., Сливкин А. И., Чистякова А. С., Агафонов В. А. Изучение углеводного состава синюхи голубой (*Polemonium caeruleum* L.). *Химия растительного сырья*. 2021;3:107–114. DOI: 10.14258/jcprm.2021038795
12. Хажжар Ф., Потанина О. Г. Определение суммы тритерпеновых сапонинов в комбинированном лекарственном средстве на основе пустырника, синюхи голубой и боярышника методом спектрофотометрии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;24(12):41–45. DOI: 10.29296/25877313-2021-12-06.
13. Никифоров Л. Н., Кривощеков С. В., Коломиец Н. Э., Кадырова Т. В., Исайкина Н. В., Абрамец Н. Ю., Безверхняя Е. А., Белоусов М. В. Разработка параметров стандартизации сырья ряски малой (Lemna minor L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):74-81. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-74-81.
14. Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Манжос К. О. Морфолого-анатомический анализ побегов тополя черного (Populus nigra L.) как перспективного источника биологически активных соединений. *Фундаментальные исследования*. 2015;2(15):3323–3329.
15. Ильина М. Б., Сергунова Е. В., Бобкова Н. В. Сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. Allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. Nessensis* Hall). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):111–117. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-111-117.
16. Басалаева И. В., Савченко О. М. Сравнительная характеристика трихом образцов синюхи голубой (*Polemonium caeruleum* L.). В сб.: Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник научных трудов X Международной научно-практической конференции молодых ученых. 15–16 декабря 2022 года. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»; 2022. С. 11–16. DOI: 10.52101/9785870191058_11.
17. Чистякова А. С., Шестакова Г. Ю., Гудкова А. А., Болгов А. С., Евсиков Ф. Д. Анализ морфологии травы синюхи голубой методами стерео- и люминесцентной микроскопии. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2023;23(3):34–38. DOI: 10.55531/2072-2354.2023.23.3.34-38.

REFERENCES

1. Atavullaeva Sh., Karomatov I. D. The medicinal plant Polemonium caeruleum. *Biology and Integrative Medicine*. 2018;5(22):67–71. (In Russ.)
2. Mal'ceva A. A., Sorokina A. A., Brezhneva T. A., Chistyakova A. S., Slivkin A. I. Herba Polemonium caeruleum – a promising source of triterpene saponins. *Pharmacy*. 2011;7:13–16. (In Russ.)
3. Khozhaenko E. V., Pak P. A., Shokur O. A., Kondrateva G. K., Podkorytova E. A. Development of a complex phytopreparation based on cyanosis blue, St. John's wort, astragalus membranous. *Traditional Medicine*. 2022;3(69):47–51. (In Russ.) DOI: 10.54296/18186173_2022_3_47.
4. Gudkova A. A., Buzlama A. V., Chistyakova A. S., Bolgov A. S., Kuznecov A. Yu., Alekseenko E. A., Slivkin A. I. Voronezh State University, assignee. Method of correction of postprandial glycemia. Patent RUS № 2805492. 17.10.2023. (In Russ.)
5. Łaska G., Sieniawska E., Świątek Ł., Zjawiony J., Khan S., Boguszewska A., Stocki M., Angielczyk M., Polz-Dacewicz M. Phytochemistry and biological activities of *Polemonium caeruleum* L. *Phytochemistry Letters*. 2019;30:314–323. DOI: 10.1016/j.phytol.2019.02.017.
6. Evseenko V. A., Gudymo A. S., Danilchenko N. V., Onkhonova G. S., Vu L. T., Ryzhikov A. B. Saponins extracted from *Polemonium caeruleum* have adjuvant activity in guinea pig intranasal immunization with trivalent influenza antigens. *Frontiers in Drug, Chemistry and Clinical Research*. 2020;3:1–5. DOI: 10.15761/FDCCR.1000142.

7. Melikov F. M. Phytotherapy of psychogenic cardiovascular diseases. *Bulletin of the state Nikita botanical gardens*. 2015;114:34–38.
8. Khishova O. M., Shcherbinin I. Yu., Dubashinskaya N. V. Sedative effect of a combination of the powders of greek valerian (Polemonium caeruleum) and common valerian (Valeriana officinalis) rhizomes and roots. *Pharmacy*. 2013;1:43–44. (In Russ.)
9. Fadi H., Potanina O. G., Abramovich R. A. Benefits of composition combined herbal drug of sedative action. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2022;25(6):46–50. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2022-06-06.
10. Shestakova G. Yu., Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Agafonov V. A. Organic acids of Polemonium coeruleum. *Bulletin of the State Nikita Botanical Garden*. 2021;138:85–91. (In Russ.) DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-85-91.
11. Gudkova A. A., Shestakova G. Yu., Slivkin A. I., Chistyakova A. S., Agafonov V. A. Study of carbohydrate composition of Polemonium coeruleum L. *Chemistry of plant raw materials*. 2021;3:107–114. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021038795.
12. Fadi H., Potanina O. G. Determination of total triterpene saponins in a combined drug based on jacob's ladder, motherwort herbs and hawthorn fruit by spectrophotometry. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2021;24(12):41–45. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2021-12-06.
13. Nikiforov L. N., Krivoshchekov S. V., Kolomiets N. E., Kadyrova T. V., Isaikina N. V., Abramets N. Y., Bezverkhniaia E. A., Belousov M. V. Development of Parameters for Standardization of Duckweed (*Lemna Minor* L.) Raw Material. *Drug development & registration*. 2021;10(1):74–81. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-74-81.
14. Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Manzhos K. O. Morphological and anatomical analysis of shoots of black poplar (*Populus nigra* L.) as a perspective source of biologically active compounds. *Fundamental research*. 2015;2(15):3323–3329. (In Russ.)
15. Ilina M. B., Sergunova E. V., Bobkova N. V. Comparative Study of Anatomical and Diagnostic Features of the Leaves of the European Dewberry (*Rubus caesius* L.), Allegheny Blackberry (*R. allegheniensis* Porter) and European Blackberry (*R. nessensis* Hall). *Drug development & registration*. 2023;12(3):111–117. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-111-117.
16. Basalaeva I. V., Savchenko O. M. Comparative characterization of trichomes of Polemonium caeruleum L. specimens. In: Modern trends in the development of health-saving technologies: Collection of scientific papers of the X International Scientific and Practical Conference of Young Scientists. December 15–16, 2022. Moscow: Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants"; 2022. P. 11–16. DOI: 10.52101/9785870191058_11. (In Russ.)
17. Chistyakova A. S., Shestakova G. Yu., Gudkova A. A., Bolgov A. S., Evsikov F. D. Analysis of herba Polemonium caeruleum morphology by stereo- and luminescence microscopy. Postgraduate *Bulletin of the Volga Region*. 2023;23(3):34–38. (In Russ.) DOI: 10.55531/2072-2354.2023.23.3.34-38.

Оригинальная статья / Research article

УДК 543.544.943.3.068.7

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2129

Check for updates

CC BY 4.0

Идентификация и количественное определение стероидного сапогенина диосгенина методом ВЭТСХ в корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino

А. Е. Суханов[1]✉, В. В. Сепп[2], К. С. Бакулин[2], А. Е. Крашенинников[2], С. В. Убушаев[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации [ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России]. 163000, Россия, Архангельская область, г. Архангельск, пр-т Троицкий, д. 51

[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации [ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет)]. 117513, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 6

✉ **Контактное лицо:** Суханов Антон Евгеньевич. **E-mail:** docpharmanton@hotmail.com

ORCID: А. Е. Суханов – https://orcid.org/0000-0002-6214-307X;
В. В. Сепп – https://orcid.org/ 0009-0009-7055-6761;
К. С. Бакулин – https://orcid.org/ 0009-0007-8138-7583;
А. Е. Крашенинников – https://orcid.org/ 0000-0002-7791-6071;
С. В. Убушаев – https://orcid.org/ 0009-0000-5323-4247.

Статья поступила: 26.06.2025 **Статья принята в печать:** 18.12.2025 **Статья опубликована:** 19.12.2025

Резюме

Введение. В оригинальной статье представлены результаты экспериментального исследования, проведенного с использованием метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), растительных образцов – корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea nipponika* Makino. Данные виды диоскорей используются в различных областях медицины в качестве фунгицидного, антимикробного, а также антисклеротического средства. Метод ВЭТСХ используется на этапе скрининга растительных образцов для предварительной идентификации и денситометрического количественного определения диосгенина в растительных экстрактах.

Цель. Разработка ВЭТСХ-методики количественной оценки содержания диосгенина после проведения кислотного гидролиза экстрактов в воздушно-сухом сырье – корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea nipponika* Makino.

Материалы и методы. Экстракты получали путем предварительного обезжиривания и депигментирования воздушно-сухого сырья корневищ с корнями изучаемых видов диоскорей дихлорметаном х.ч. с последующим двойным экстрагированием. Первое экстрагирование проводили в среде 50%-го водного раствора изопропанола х.ч. при озвучивании ультразвуком с последующим проведением кислотного гидролиза О-гликозидных связей, упариванием. Второе экстрагирование проводили путем перерастворения сухого остатка в метаноле х.ч.; очищали от взвешенных частиц фильтрованием через шприцевые фильтры с диаметром перфораций 20 мкм. ВЭТСХ осуществляли на аппаратном комплексе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин HPTLC Aluminium sheets Silica gel 60 F254, 20 × 20 см, которые разрезали до размера 20 × 10 см.

Результаты и обсуждение. После проведения сканирующей денситометрии при 366 и 542 нм было установлено, что хроматографирование метанольных извлечений в системе растворителей толуол х.ч. – хлороформ х.ч. – ацетон х.ч. (2 : 8 : 2 по объему) позволяет удовлетворительно провести разделение и последующее денситометрическое количественное определение диосгенина. Сравнение треков растительных экстрактов корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino проводили со стандартным образцом диосгенина.

Заключение. Проведенное исследование позволило установить, что содержание стероидного сапогенина диосгенина в воздушно-сухом сырье *Dioscorea nipponica* Makino (286,4–296,3 мкг/г) незначительно преобладает над его содержанием в сырье *Dioscorea caucasica* Lipsky (257–277,1 мкг/г). Полученные количественные значения, рассчитанные раздельно по высоте и площади пиков, демонстрируют хорошую сходимость, что подтверждает корректность методики. Разработанный метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием диосгенина может быть рекомендован для рутинного количественного анализа данного соединения в растительном сырье.

© Суханов А. Е., Сепп В. В., Бакулин К. С., Крашенинников А. Е., Убушаев С. В., 2026
© Sukhanov A. E., Sepp V. V., Bakulin K. S., Krasheninnikov A. E., Ubushaev S. V., 2026

Ключевые слова: диосгенин, корневища с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino, ВЭТСХ

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

Вклад авторов. А. Е. Суханов – разработка дизайна исследования, написание статьи, проведение исследования на приборном комплексе по ВЭТСХ CAMAG (Швейцария). В. В. Сепп – написание статьи. К. С. Бакулин – сбор данных, написание статьи. А. Е. Крашенинников – рецензирование и редактирование статьи. С. В. Убушаев – написание статьи.

Финансирование. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Северного государственного медицинского университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Для цитирования: Суханов А. Е., Сепп В. В., Бакулин К. С., Крашенинников А. Е., Убушаев С. В. Идентификация и количественное определение стероидного сапогенина диосгенина методом ВЭТСХ в корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):115–123. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2129

Identification and quantification of the steroidal sapogenin diosgenin by HPTLC in rhizomes with roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino

Anton E. Sukhanov[1]✉, Vladislav V. Sepp[2], Konstantin S. Bakulin[2], Anatoliy E. Krasheninnikov[2], Sandji V. Ubushaev[2]

[1] Northern State Medical University. 51, prospekt Troitsky, Arkhangelsk, Arkhangelsk region, 163000, Russia
[2] Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «N. I. Pirogov Russian National Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSAEI HE N. I. Pirogov RNRMU MOH Russia). 1/6, Ostrovityanova str., Moscow, 117513, Russia

✉ **Corresponding author:** Anton E. Sukhanov. **E-mail:** docpharmanton@hotmail.com

ORCID: Anton E. Sukhanov – https://orcid.org/0000-0002-6214-307X;
Vladislav V. Sepp – https://orcid.org/ 0009-0009-7055-6761;
Konstantin S. Bakulin – https://orcid.org/ 0009-0007-8138-7583;
Anatoliy E. Krasheninnikov – https://orcid.org/ 0000-0002-7791-6071;
Sandji V. Ubushaev – https://orcid.org/ 0009-0000-5323-4247.

Received: 26.06.2025 **Accepted:** 18.12.2025 **Published:** 19.12.2025

Abstract

Introduction. The original article presents the results of an experimental study conducted using the method of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) on plant samples – rhizomes with roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino. These species of Dioscorea are used in various fields of medicine as fungicides, antimicrobials, and anti-sclerotic agents. The HPTLC method is used at the screening stage of plant samples for preliminary identification and densitometric quantitative determination of diosgenin in plant extracts.

Aim. Development of a HPTLC methodology for quantitative assessment of diosgenin content after acid hydrolysis of extracts in air-dried raw materials – rhizomes with roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino.

Materials and methods. The extracts were obtained by preliminary degreasing and depigmentation of air-dried rhizomes with roots of the studied Dioscorea species using high-purity dichloromethane, followed by double extraction. The first extraction was carried out in a 50 % aqueous solution of isopropanol with ultrasonication, followed by acid hydrolysis of O-glycosidic bonds and evaporation. The second extraction was carried out by redissolving the dry residue in methanol; it was purified from suspended particles by filtration through syringe filters with a perforation diameter of 20 μm. HPTLC was performed on a «CAMAG» (Switzerland) apparatus using HPTLC Aluminum sheets Silica gel 60 F254 20 × 20 cm, which were cut to a size of 20 × 10 cm.

Results and discussion. After performing scanning densitometry at 366 and 542 nm, it was established that the chromatography of methanol extracts in a toluene-chloroform-acetone solvent system (2:8:2 v/v) allows for satisfactory separation and subsequent densitometric quantitative determination of diosgenin. The tracks of plant extracts from the rhizomes and roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino were compared with a standard sample of diosgenin.

Conclusion. The study found that the content of the steroid sapogenin diosgenin in air-dried *Dioscorea nipponica* Makino raw material (286,4–296,3 μg/g) slightly exceeds its content in *Dioscorea caucasica* Lipsky raw material (257–277,1 μg/g). The quantitative values obtained, calculated separately for peak height and area, show good convergence, confirming the correctness of the method. The developed method of high-performance thin-layer chromatography with densitometric detection of diosgenin can be recommended for routine quantitative analysis of this compound in plant raw materials.

Keywords: diosgenin, rhizomes with roots of Dioscorea caucasica Lipsky and Dioscorea nipponika Makino, HPTLC

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

Contribution of the authors. Anton E. Sukhanov – development of the study design, writing the article, conducting the study on the HPTLC instrument complex CAMAG (Switzerland). Vladislav V. Sepp – article writing. Konstantin S. Bakulin – data collection, article writing. Anatoliy E. Krasheninnikov – reviewing and editing the article. Sandji V. Ubushaev – article writing.

Funding. This work was supported by the budget of the Northern State Medical University. No additional grants were received for the conduct or management of this specific study.

For citation: Sukhanov A. E., Sepp V. V., Bakulin K. S., Krasheninnikov A. E., Ubushaev S. V. Identification and quantification of the steroidal sapogenin diosgenin by HPTLC in rhizomes with roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino. *Drug development & registration*. 2026;15(1):115–123. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2129

ВВЕДЕНИЕ

Диоскорея кавказская (*Dioscorea caucasica* Lipsky) и диоскорея ниппонская (*Dioscorea nipponika* Makino) являются растительными источниками нативного диосцина, агликоном которого является диосгенин. В ряде исследований отмечены фармакологические свойства диосгенина, такие как фунгицидные, цитотоксические и антимикробные. *Dioscorea caucasica* Lipsky является эндемичным видом Закавказья, окрестностей города Сочи в России и распространена на территории республики Абхазии. *Dioscorea nipponika* Makino является эндемичным видом Дальнего Востока России и сопредельных государств.

Целью нашего исследования была разработка ВЭТСХ-методики количественной оценки содержания диосгенина после проведения кислотного гидролиза экстрактов в воздушно-сухом сырье – корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky, *Dioscorea nipponika* Makino.

Промышленное значение среди стероидных сапогенинов имеет диосгенин, который получают из корневищ с корнями некоторых видов диоскорей [1]. Основными поставщиками корневищ с корнями видов диоскорей являются Мексика, страны Центральной Америки, Индия и Китай, где массово заготавливают данный вид сырья из производящих растений, таких как *Dioscorea composita, D. floribunda, D. tepinapensis, D. prazeri, D. sylvatica, D. belizensis, D. zingiberensis* [1]. Кроме корневищ с корнями видов диоскорей, для малотоннажного производства диосгенина используют и другие виды растительного сырья, например траву паслена, корневища с корнями ямса, семена пажитника сенного, листья и корневища с корнями видов юкк (юкка славная, юкка Треккуля, юкка узколистная, юкка сизая и т. п.). Корневища с корнями видов диоскореи, в том числе кавказской и ниппонской, широко используются в медицине. Важной характеристикой стероидных спиростаноловых гликозидов, которая лежит в основе их биологической активности, является склонность к образованию комплексов со стеринами. В просвете желудочно-кишечного тракта диосгенин способен образовывать комплексы с холестерином, поступающим с пищей. Кроме того, стероидные сапонины демонстрируют широкий спектр биологических эффектов, включая антимикробное, противоопухолевое и гемолитическое действие, купирование симптомов аутоиммунных заболеваний в эксперименте и противовоспалительное действие [1–6].

Медицинская и фармацевтическая промышленность проявляет большой интерес к диосгенину, активному вторичному метаболиту растительных клеток. В биотехнологии это соединение выступает в качестве исходного субстрата (прекурсора) для получения стероидных гормонов [7–10].

Метод ВЭТСХ является хорошей альтернативой колоночным методам хроматографии (высокоэффективной жидкостной и газо-жидкостной хроматографии), поскольку он является экономичным (отсутствие необходимости приобретать дорогостоящие колонки), экспрессным (одновременно можно анализировать несколько десятков растительных экстрактов на одной пластине), менее трудоемким по сравнению с колоночными видами хроматографии, используется в стандартизации растительных экстрактов и растительных настоек по методу «отпечатков пальцев» [11–14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стандарт диосгенина (чистота >99 %) был получен от PhytoLab (Германия). Растворители для экстракции и проведения ВЭТСХ, такие как изопропанол х.ч., метанол х.ч., толуол х.ч., ацетон х.ч., хлороформ х.ч., кислота серная, были приобретены у компании АО «ВЕКТОН» (Россия) и ООО «Компонент-Реактив» (Россия). Воду очищали при помощи установки для

получения воды аналитического качества УПВА-5 (ООО ПФ «Ливам», Россия). Растительный материал (корневища с корнями в рубленом виде) был приобретен у двух российских компаний: диоскореи кавказской – у ООО «Шалфей» (г. Иркутск, без серии, собранные летом 2017 года), диоскореи ниппонской – у ООО «Старослав» (г. Бердск, серия 010417, собранные летом 2016 года).

Методика экстрагирования стероидных сапонинов подробно описана в статье [15]. Методика кислотного гидролиза О-гликозидной связи, равно как и альтернативные методы экстракции стероидных сапонинов, описаны в источнике [1]. После кислотного гидролиза изопропаноловый экстракт упаривали в открытых пробирках досуха, взвешивали на аналитических весах (точная навеска), после приливали 10 мл метанола х.ч. Для удаления взвешенных частиц из полученного метанольного раствора использовали фильтры нейлоновые шприцевые Labfil 0,22 мкм диаметром 25 мм для фильтрования водных и органических растворов, серия C0000279, лот K11182SF (Labfil, Китай).

Приготовление раствора СО диосгенина. Для приготовления раствора стандарта диосгенина с концентрацией 1 мг/мл берут точную навеску 20 мг стандарта диосгенина и растворяют в 20 мл метанола. Отбирают 2,5 мл раствора с концентрацией 1 мг/мл и доводят метанолом до объема 10 мл (раствор диосгенина с концентрацией 0,25 мг/мл).

Для идентификации и количественного денситометрического определения диосгенина в растительных извлечениях диоскореи кавказской и диоскореи ниппонской была использована методика высокоэффективной тонкослойной хроматографии, которая ранее успешно применялась для определения данного соединения в растительных извлечениях других растительных организмов [16–20].

Использованы высокоэффективные пластины на алюминиевой фольге HPTLC Aluminium sheets Silica gel 60 F254, 20 × 20 см, которые нарезались на сегменты форматом 20 × 10 см. Толщина слоя силикагеля на пластинах – 150–200 мкм.

Нанесение: аппликатор Automatic TLC Sampler 4 (CAMAG, Швейцария), тип нанесения – Spray. Ширина штриха – 6 мм, отступ слева – 15 мм, отступ от нижнего края пластины –10 мм, дистанция между треками – 10 мм, число треков – 12. Расстояние между треками – 6 мм. Техника разделения – восходящая. Раствор стандартного образца диосгенина с концентрацией 0,25 мг/мл наносился объемами 1,5; 2; 2,5 мкл.

Элюирование: автоматическая камера Automatic Developing Chamber 2 (CAMAG, Швейцария) с блоком контроля влажности при 31,5 %, температура в камере – 24 °C, насыщение (saturation) камеры – 5 мин (с фильтровальной бумагой) – 25 мл подвижной фазы, элюирование (development) – 10 мл подвижной фазы, сушка – 5 мин.

Состав подвижной фазы: толуол – хлороформ – ацетон (2 : 8 : 2 по объему). Дистанция фронта элюента – 80 мм.

Дериватизация: устройство для иммерсии Chromatogram Immersion Device III (CAMAG, Швейцария). Параметры: время – 2 с, скорость – 1. Метод дериватизации – иммерсия (погружение). Реагент – кислота серная концентрированная : вода : метанол в соотношении 20 мл – 170 мл – 10 мл соответственно. Реактивы предварительно охлаждают и смешивают при охлаждении. После иммерсии нагревание пластины проводится в течение 10 мин при температуре 105–110 °C.

Документирование: система документирования TLC Visualizer (CAMAG, Швейцария). Чистая пластина, пластина после элюирования и пластина после дериватизации фотографировалась в трех режимах: УФ254, УФ366 и white R (в режиме «белого света»).

Денситометрия: спектроденситометр TLC Scanner 4 (CAMAG, Швейцария) с программным обеспечением winCATS в режиме поглощения при 542 нм с вольфрамовой лампой, в режиме флуоресценции при 366 нм с ртутной лампой.

Количественное определение диосгенина в пробе проводили с использованием многоточечной калибровки. Для повышения точности результатов калибровочные зависимости строили раздельно по высоте и площади пиков. Выбор параметра сигнала (высота или площадь пика) проводили путем сравнения величин коэффициента корреляции и коэффициента вариации (CV) с максимальным первым и минимальным вторым коэффициентом одновременно.

Статистический анализ. Эксперименты проводились в трех повторениях, и переменные были представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, а также для средних арифметических были рассчитаны 95 % доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет содержания диосгенина в экстрактах корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino.

В ходе исследования фотографирование пластин осуществлялось после элюирования при 366 нм, а также после дериватизации при 366 нм и в видимой области спектра – в режиме white R (рисунок 1).

Для сравнения чистоты спектров пятен-штрихов стандартного образца диосгенина и аналогичных пятен-штрихов диосгенина в экстрактах двух видов диоскорей после дериватизации был выполнен спектральный анализ при длине волны 542 нм, который показывает, что спектры треков стандарта и образцов практически идентичны (рисунок 2).

Экстремумы длин волн лежат в интервале от 541 до 545 нм. Разброс значений экстремумов объясняется различной концентрацией диосгенина в растворах стандартов с учетом объемов нанесения. При

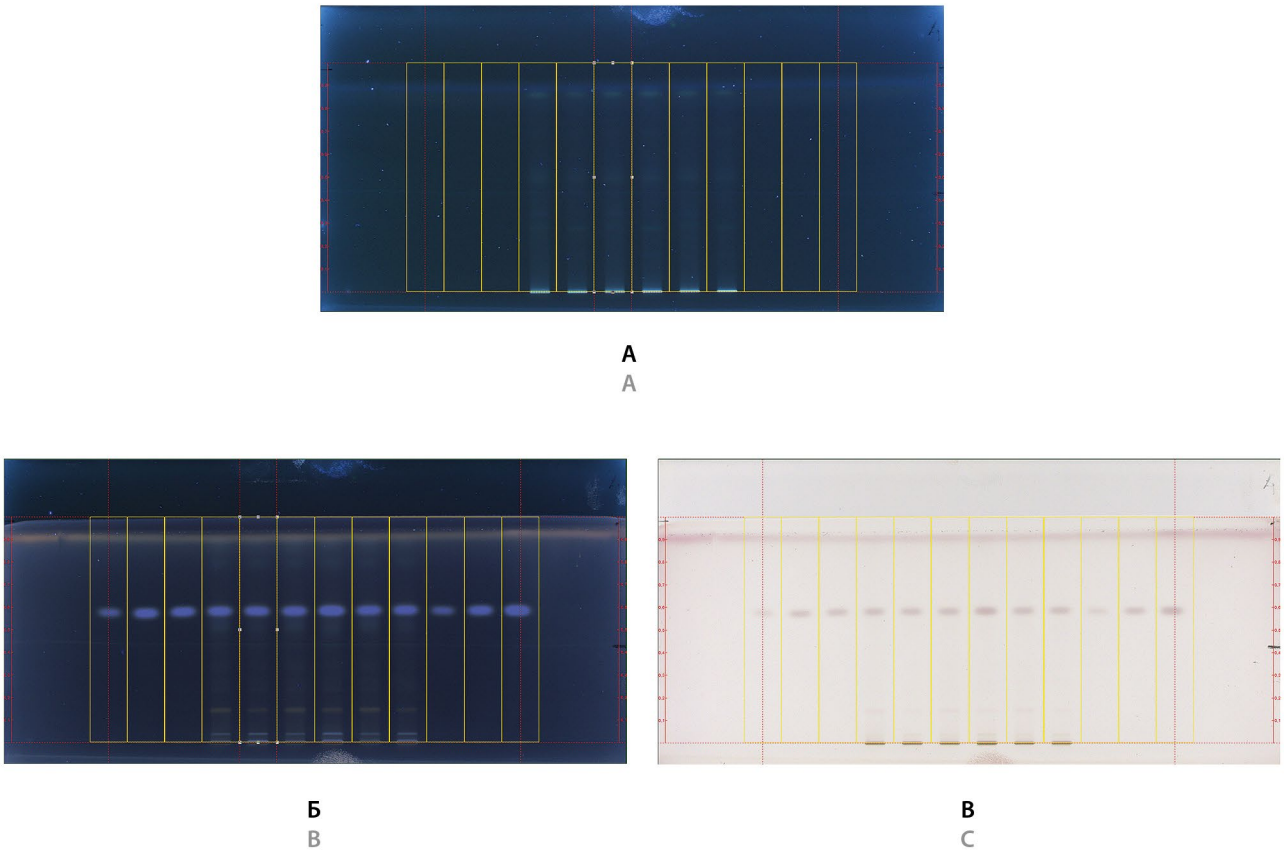


Рисунок 1. Фотографии пластин:
А – после элюирования при 366 нм; Б – после дериватизации при 366 нм; В – после дериватизации в режиме white R

Figure 1. Photographs of plates:
A – after elution at 366 nm; B – after derivatization at 366 nm; C – after derivatization in white R mode

большем содержании диосгенина (независимо, стандарт или проба) экстремумы полос поглощения наблюдаются около 541 нм.

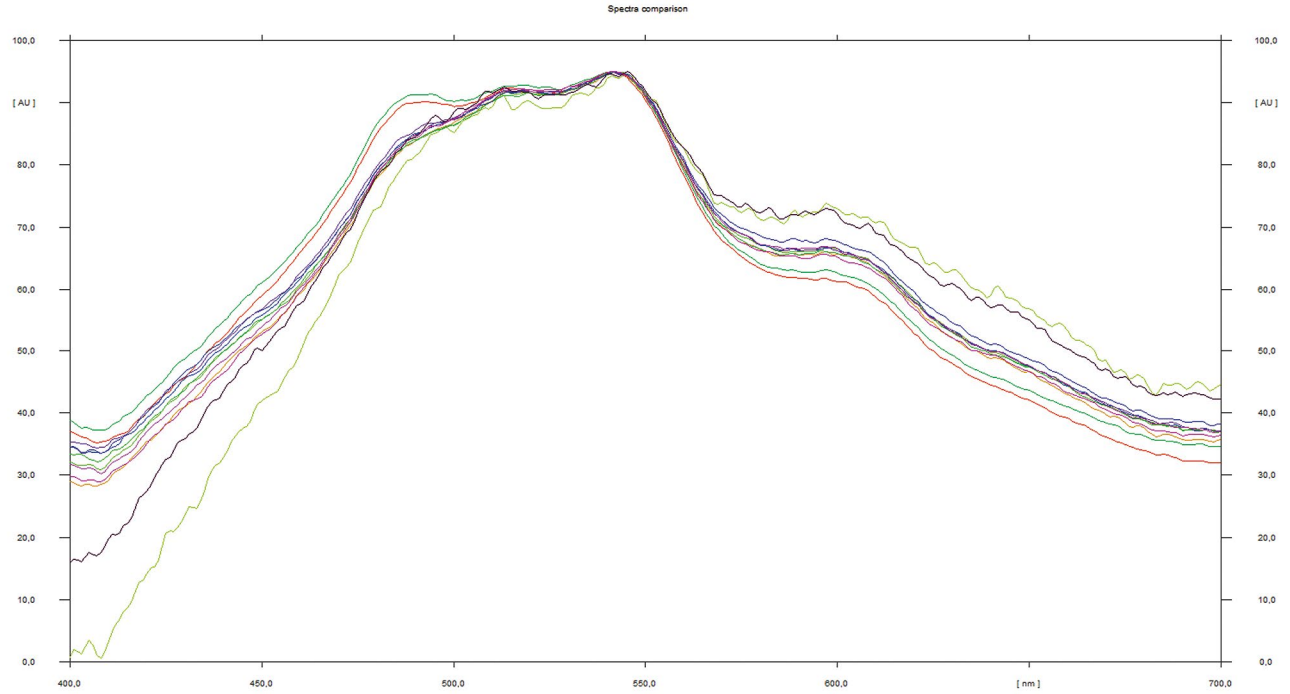
С целью количественного определения содержания диосгенина в корневищах с корнями двух видов диоскореи, *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino, были получены растительные извлечения, которые в дальнейшем подвергались кислотному гидролизу для разрыва О-гликозидных связей в молекулах стероидных гликозидов, содержащих в качестве агликонов стероидный сапогенин диосгенин [1, 2].

В таблицах 1 и 2 приведены данные денситометрии ($n = 3$) для экстракта из корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky по высоте и площади пиков при длинах волн 366 нм и 542 нм соответственно.

Таблица 1. Параметры денситометрии экстракта корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky при длине волны 366 нм

Table 1. Densitometry parameters of the extract of rhizomes with roots *Dioscorea caucasica* Lipsky at a wavelength of 366 nm

Трек Track	**Объем для нанесения, мкл** Volume for application, µl	**Высота пика, AU** Peak height, AU	**Расчет содержания (по высоте пика), нг/пятно** Calculation of content (by peak height), ng/spot	**Площадь пика, AU** Peak area, AU	**Расчет содержания (по площади пика), нг/пятно** Calculation of content (by peak area), ng/spot
4	2	355,60	495,50	8704,04	554,30
6	2	363,13	509,12	7996,86	502,58
8	2	368,86	519,48	8534,93	541,93
M (σ)	2	362,53	508,033 (12,03) $\pm\Delta x$ = 478,15–537,92	8411,94	532,94 (27,01) $\pm\Delta x$ = 465,84–600,04



А
A

Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Color Hex
1	0,59	Diosgenin	80 AU @ 545 nm	
2	0,59	Diosgenin	189 AU @ 542 nm	
3	0,6	Diosgenin	190 AU @ 541 nm	
4	0,6	Diosgenin	205 AU @ 541 nm	
5	0,59	Diosgenin	194 AU @ 542 nm	
6	0,59	Diosgenin	204 AU @ 541 nm	
7	0,59	Diosgenin	272 AU @ 541 nm	
8	0,59	Diosgenin	200 AU @ 542 nm	
9	0,59	Diosgenin	184 AU @ 542 nm	
10	0,59	Diosgenin	65 AU @ 545 nm	
11	0,59	Diosgenin	176 AU @ 541 nm	
12	0,59	Diosgenin	253 AU @ 541 nm	

Б
B

Рисунок 2. Спектры стандарта диосгенина и спектры диосгенина в экстрактах *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipponika* Makino при 542 нм.

А – спектральный рисунок; Б – значения максимальных сигналов для каждого из треков и его цветовая маркировка. Треки 1, 2, 3, 10, 11 и 12, нанесенные в объемах 1 мкл (треки 1 и 10), 2 мкл (треки 2 и 11) и 3 мкл (треки 3 и 12), принадлежат стандартному раствору диосгенина с концентрацией 0,25 мг/мл, треки 4, 6 и 8 принадлежат диосгенину из извлечения корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky, треки 5, 7 и 9 принадлежат диосгенину из извлечения корневищ с корнями *Dioscorea nipponica* Makino

Figure 2. Spectra of the diosgenin standard and spectra of diosgenin in extracts of *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea nipponika* Makino at 542 nm.

A – Spectral pattern; B – maximum signal values for each track and its color coding. Tracks 1, 2, 3, 10, 11, and 12 belong to the standard diosgenin solution with a concentration of 0.25 mg/ml, applied in volumes of 1 µl (tracks 1 and 10), 2 µl (tracks 2 and 11) and 3 µl (tracks 3 and 12), tracks 4, 6, and 8 belong to diosgenin from the extract of rhizomes with roots of *Dioscorea caucasica* Lipsky, tracks 5, 7, and 9 belong to diosgenin from the extract of rhizomes with roots of *Dioscorea nipponica* Makino

Таблица 2. Параметры денситометрии экстракта корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky при длине волны 542 нм

Table 2. Densitometry parameters of the extract of rhizomes with roots *Dioscorea caucasica* Lipsky at a wavelength of 542 nm

Трек Track	Объем для нанесения, мкл Volume for application, µl	Высота пика, AU Peak height, AU	Расчет содержания (по высоте пика), нг/пятно Calculation of content (by peak height), ng/spot	Площадь пика, AU Peak area, AU	Расчет содержания (по площади пика), нг/пятно Calculation of content (by peak area), ng/spot
4	2	115,39	517,09	2680,10	552,78
6	2	116,82	524,94	2668,19	550,17
8	2	116,02	520,54	2638,82	543,76
M (σ)	2	116,08	520,86 (3,93) ±Δ*x* = 511,10–530,62	2662,37	548,90 (4,64) ±Δ*x* = 537,37–560,43

Таблица 3. Параметры денситометрии экстракта корневищ с корнями *Dioscorea nipponica* Makino при длине волны 366 нм

Table 3. Densitometry parameters of the extract of rhizomes with roots *Dioscorea nipponica* Makino at a wavelength of 366 nm

Трек Track	Объем для нанесения, мкл Volume for application, µl	Высота пика, AU Peak height, AU	Расчет содержания (по высоте пика), нг/пятно Calculation of content (by peak height), ng/spot	Площадь пика, AU Peak area, AU	Расчет содержания (по площади пика), нг/пятно Calculation of content (by peak area), ng/spot
5	2	355,84	495,93	8314,90	525,84
7	2	362,53	507,96	8382,58	530,90
9	2	369,03	519,79	8452,27	535,89
M (σ)	2	362,47	507,89 (11,93); ±Δ*x* = 478,26–537,53	8383,25	530,88 (5,03); ±Δ*x* = 518,39–543,36

В таблицах 3 и 4 приведены данные денситометрии ($n = 3$) для экстракта из корневищ с корнями *Dioscorea nipponica* Makino по высоте и площади пиков при длинах волн 366 нм и 542 нм соответственно.

Для подсчета содержания в воздушно-сухом сырье корневищ с корнями изучаемых видов диоскорей стероидного сапогенина диосгенина используют переменные: влажность сырья корневищ с корнями диоскореи кавказской – 5,05 %, корневищ с корнями диоскореи ниппонской – 11,65 %.

Содержание диосгенина в корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky с использованием точной навески высушенного сырья 0,5050 г отражено в таблице 5.

Таблица 4. Параметры денситометрии экстракта корневищ с корнями *Dioscorea nipponica* Makino при длине волны 542 нм

Table 4. Densitometry parameters of the extract of rhizomes with roots *Dioscorea nipponica* Makino at a wavelength of 542 nm

Трек Track	Объем для нанесения, мкл Volume for application, µl	Высота пика, AU Peak height, AU	Расчет содержания (по высоте пика), нг/пятно Calculation of content (by peak height), ng/spot	Площадь пика, AU Peak area, AU	Расчет содержания (по площади пика), нг/пятно Calculation of content (by peak area), ng/spot
5	2	112,82	502,94	2535,08	519,19
7	2	114,73	512,91	2526,35	518,73
9	2	114,63	508,90	2543,52	522,94
M (σ)	2	114,06	508,25 (5,02); ±Δ*x* = 495,79–520,71	2 534,98	520,29 (2,31); ±Δ*x* = 514,55–526,02

Таблица 5. Содержание диосгенина в корневищах с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky

Table 5. Diosgenin content in rhizomes with roots *Dioscorea caucasica* Lipsky

По высоте пика при 366 нм, мкг/г By peak height at 366 nm, μg/g	По площади пика при 366 нм, мкг/г By peak area at 366 nm, μg/g	По высоте пика при 542 нм, мкг/г By peak height at 542 nm, μg/g	По площади пика при 542 нм, мкг/г By peak area at 542 nm, μg/g
253,8	266,2	260,2	287,9

Среднее содержание диосгенина в воздушно-сухом сырье корневищ с корнями *Dioscorea caucasica* Lipsky по высоте пика составляет 257 мкг/г, по площади пика составляет 277,1 мкг/г.

Содержание диосгенина в корневищах с корнями *Dioscorea nipponica* Makino с использованием точной навески высушенного сырья 0,5070 г отражено в таблице 6.

Таблица 6. Содержание диосгенина в корневищах с корнями *Dioscorea nipponica* Makino

Table 6. Diosgenin content in rhizomes with roots *Dioscorea nipponica* Makino

По высоте пика при 366 нм, мкг/г By peak height at 366 nm, μg/g	По площади пика при 366 нм, мкг/г By peak area at 366 nm, μg/g	По высоте пика при 542 нм, мкг/г By peak height at 542 nm, μg/g	По площади пика при 542 нм, мкг/г By peak area at 542 nm, μg/g
286,3	299,2	286,5	293,3

Среднее содержание диосгенина в воздушно-сухом сырье корневищ с корнями *Dioscorea nipponica* Makino по высоте пика составляет 286,4 мкг/г, по площади пика составляет 296,3 мкг/г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить, что содержание стероидного сапогенина диосгенина в воздушно-сухом сырье *Dioscorea nipponica* Makino (286,4–296,3 мкг/г) незначительно преобладает над его содержанием в сырье *Dioscorea caucasica* Lipsky (257–277,1 мкг/г). Полученные количественные значения, рассчитанные раздельно по высоте и площади пиков, демонстрируют хорошую сходимость, что подтверждает корректность методики. Разработанный метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием диосгенина может быть рекомендован для рутинного количественного анализа данного соединения в растительном сырье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Zhang X., Zhang Y., Guo Y., Xue P., Xue Z., Zhang Y., Zhang H., Ito Y., Dou J., Guo Z. Research progress of diosgenin extraction from *Dioscorea zingiberensis* C. H. *Wright*: Inspiration of novel method with environmental protection and efficient characteristics. *Steroids*. 2023;192:109181. DOI: 10.1016/j.steroids.2023.109181.
2. Zhou L., Luo J., Wei Y., Han L., Sun A., Zhang M., Hu D., Yang H., Tang R., Xie P., Zhao L. *Dioscorea nipponica* Makino: Unraveling multi-target mechanisms and clinical potential in autoimmune disease therapy. *Journal of ethnopharmacology*. 2025;353:120272. DOI: 10.1016/j.jep.2025.120272.
3. Cai M., Mao Y., Gao W., Wang Z., Mao J., Sha R. Insights into diosgenin against inflammatory bowel disease as functional food based on network pharmacology and molecular docking. *Heliyou*. 2024;10(18):e37937. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e37937.
4. Nazir R., Kumar V., Dey A., Pandey D. K. HPTLC quantification of diosgenin in *Dioscorea deltoidea*: evaluation of extraction efficacy, organ selection, drying method and seasonal variation. *South African Journal of Botany*. 2021;138:386–393. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.12.027.
5. Dangwal L. R., Chauhan A. S. *Dioscorea deltoidea* Wall. *Exgriseb*. A highly threatened himalayan medicinal plant: an overview. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2015;6(1):452–460.
6. Zhou Q., Sun H. J., Liu S. M., Jiang X. H., Wang Q. Y., Zhang S., Yu D. H. Anti-inflammation effects of the total saponin fraction from *Dioscorea nipponica* Makino on rats with gouty arthritis by influencing MAPK signalling pathway. *BMC Complement Medicine and Therapies*. 2020;20(1):261. DOI: 10.1186/s12906-020-03055-7.
7. Raina A. P., Misra R. C. Evaluation of diosgenin, a bioactive compound from natural source of *Dioscorea species*: a wild edible tuber plant. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2020;9(1):1120–1124.
8. Naseem N., Khaliq T., Jan S., Nabi S., Sultan P., Hassan Q. P., Mir F. A. An overview on pharmacological significance, phytochemical potential, traditional importance and conservation strategies of *Dioscorea deltoidea*: A high valued endangered medicinal plant. *Heliyon*. 2024;10(10):e31245. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e31245.
9. Techen N., Parveen I., Khan I. A. A single molecular marker to distinguish between species of *Dioscorea*. *Genome*. 2017;60(3):201–207. DOI: 10.1139/gen-2015-0105.
10. Seeman J. I. Russell earl marker and the beginning of the steroidal pharmaceutical industry. *The Chemical Records*. 2023:23(4):e202300048. DOI: 10.1002/tcr.202300048.
11. Krüger S., Hüsken L., Fornasari R., Scainelli I., Morlock G. E. Effect-directed fingerprints of 77 botanical extracts via a generic high-performance thin-layer chromatography method combined with assays and mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*. 2017;1529:93–106. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.10.068.
12. Oellig C., Schunck J., Schwack W. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2018;1533:208–212. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.12.019.

13. Pandey D. K., Kaur P. Optimization of extraction parameters of pentacyclic triterpenoids from *Swertia chirata* stem using response surface methodology. *3 Biotech*. 2018;8(3):152. DOI: 10.1007/s13205-018-1174-6.
14. Kumar A., Pandey A., Gaur N. K., Vishwakarma S. K., Dalua S. S., Tiwari P., Valavan R. Development and validation of HPTLC fingerprint method for 16 homeopathic mother tinctures lacking standards. *Biomedical Chromatography*. 2025;39(10):E70194. DOI: 10.1002/bmc.70194.
15. Суханов А. Е., Крылов И. А., Сепп В. В., Бакулин К. С. Предварительный качественный анализ растительных образцов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии на присутствие стероидных сапогенинов некоторых представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые и норичниковые. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;3(1):159–174. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1433. [Sukhanov A. E., Krylov I. A., Sepp V. V., Bakulin K. S. Preliminary qualitative analysis of plant samples by high-performance thin-layer chromatography for the presence of steroid sapogenins of some representatives of the Dioscoreacae, Fabaceae, Ranunculaceae, Melanthiaceae, Scrophulariaceae. *Drug development & registration*. 2024;13(1):159–174. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1433.]
16. Kharat S. N., Singh R., Mendhulkar V. D. Quantitative analysis for diosgenin content in *Elephantopus scaber* (Linn.) by HPTLC using successive solvent extraction method. *Der Pharmacia Letter*. 2015;7(5):236–244.
17. Król-Kogus B., Lamine K. M., Migas P., Boudjeniba M., Krauze-Baranowska M. HPTLC determination of diosgenin in fenugreek seeds. *Acta Pharmaceutica*. 2018;68:97–107. DOI: 10.2478/acph-2018-0002.
18. Salunkhe R., Gadgoli C., Naik A., Patil N. Pharmacokinetic profile and oral bioavailability of diosgenin, charantin, and hydroxychalcone from a polyherbal formulation. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:629272. DOI: 10.3389/fphar.2021.629272.
19. Nagamma T., Konuri A., Bhat K. M. R., Maheshwari R., Udupa P., Nayak Y. Modulation of inflammatory markers by petroleum ether fraction of *Trigonella foenum-graecum L.* seed extract in ovariectomized rats. *Journal of Food Biochemistry*. 2021;45:E13690. DOI: 10.1111/jfbc.13690.
20. Bhat M. H., Fayaz M., Kumar A., Dar A. A., Jain A. K. Development of an efficient micropropagation system for *Dioscorea bulbifera L.* and phytochemical profile of regenerated plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2022;20(1):107. DOI: 10.1186/s43141-022-00382-9.

Оригинальная статья / Research article

УДК 57.083.18

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2150

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка, валидация и применение методики оценки жизнеспособности *Escherichia coli* с помощью проточной цитометрии

А. С. Казакова[1]✉, А. Н. Афанасьева[1], А. А. Еврейская[1], А. Д. Акино[1], А. К. Зенкова[1], В. Б. Сапарова[1], З. Р. Хасаншина[1, 2], М. Д. Бочкарева[1], Р. В. Драй[1]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, поселок Стрельна, ул. Связи, д. 34-А

[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (Университет ИТМО). 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д. 49, литер А

✉ **Контактное лицо:** Казакова Анна Сергеевна. **E-mail:** anna.kazakova@geropharm.com

ORCID: А.С. Казакова – https://orcid.org/0000-0002-5983-4080;
А. Н. Афанасьева – https://orcid.org/0000-0002-1443-4294;
А. А. Еврейская – https://orcid.org/0009-0004-0137-8467;
А. Д. Акино – https://orcid.org/0000-0001-6516-7184;
А. К. Зенкова – https://orcid.org/0009-0001-5183-6874;
В. Б. Сапарова – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
З. Р. Хасаншина – https://orcid.org/0000-0002-0065-1853;
М. Д. Бочкарева – https://orcid.org/0009-0001-1489-2957;
Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Статья поступила: 22.07.2025 **Статья принята в печать:** 30.01.2026 **Статья опубликована:** 30.01.2026

Резюме

Введение. Около 30 % генно-инженерных терапевтических белков производится в *Escherichia coli*. При наработке рекомбинантных белков одним из факторов, определяющих эффективность процесса и качество продукта, является показатель жизнеспособности клеток. Важно контролировать жизнеспособность при формировании банков клеток и оценке их стабильности в процессе хранения, а также при разработке условий культивирования штаммов. Изменение условий хранения или культивирования может приводить к изменению структуры клеточной популяции с изменением соотношения жизнеспособных, мертвых и находящихся в апоптозоподобной гибели (ALD, apoptosis-like death) клеток. Одним из способов оценки популяций клеток может являться метод проточной цитометрии с окрашиванием.

Цель. Разработать, валидировать и апробировать методику оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием проточной цитометрии.

Материалы и методы. Для оценки жизнеспособности клеток проводили окрашивание *E. coli* пропидия йодидом (PI) и аннексином V-FITC (An-V-FITC). При помощи двойного окрашивания определяли популяции клеток живых, мертвых и в ALD. Валидацию методики проводили согласно Государственной фармакопее, решению Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 и рекомендациям ICH. Анализировали применимость методики при разработке условий создания банков клеток и их культивировании.

Результаты и обсуждение. Разработана методика оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием проточной цитометрии и окрашивания PI с An-V-FITC, позволяющая оценить популяции клеток живых, мертвых и в ALD. По итогам валидации методики установлено ее соответствие критериям: специфичности (6 %), линейности ($R^2 > 0,9$), правильности (97–102 %), пределу количественного определения (подтвержден, 117 %), сходимости (1–10 %), внутрилабораторной прецизионности (2–17 %), аналитической области (6,4–100 %). При оптимизации условий создания банков клеток оценка жизнеспособности позволила определить, что для получения более 97 % жизнеспособных клеток после выхода из криоконсервации необходимо использовать соотношение объемов культуральной жидкости и криопротектора 3 к 1 при оптической плотности суспензии $OD_{600} = 15$. При разработке процесса культивирования штамма методика позволила определить оптимальные условия, в результате в биореакторе за 8 часов индукции процент мертвых клеток увеличился всего на 2,5 %, а клеток в состоянии ALD – на 7 %.

© Казакова А. С., Афанасьева А. Н., Еврейская А. А., Акино А. Д., Зенкова А. К., Сапарова В. Б., Хасаншина З. Р., Бочкарева М. Д., Драй Р. В., 2026
© Kazakova A. S., Afanaseva A. N., Evreiskaya A. A., Akino A. D., Zenkova A. K., Saparova V. B., Khasanshina Z. R., Bochkareva M. D., Drai R. V., 2026

Заключение. Разработана и валидирована методика для оценки жизнеспособности *E. coli*, она может использоваться на этапе разработки и производства терапевтических продуктов.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, проточная цитометрия, жизнеспособность прокариотических клеток, *E. coli*, валидация методики

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

Вклад авторов. А. С. Казакова, А. Д. Акино, М. Д. Бочкарева и З. Р. Хасаншина разрабатывали методологию и планы экспериментов. А. С. Казакова, А. А. Еврейская, А. К. Зенкова проводили эксперименты. А. Н. Афанасьева и В. Б. Сапарова участвовали в подборе валидационных параметров и обработке данных по валидации. А. С. Казакова, З. Р. Хасаншина, М. Д. Бочкарева участвовали в написании текста статьи. Р. В. Драй руководил работой. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

Для цитирования: Казакова А. С., Афанасьева А. Н., Еврейская А. А., Акино А. Д., Зенкова А. К., Сапарова В. Б., Хасаншина З. Р., Бочкарева М. Д., Драй Р. В. Разработка, валидация и применение методики оценки жизнеспособности *Escherichia coli* с помощью проточной цитометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):124–134. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2150

Development, validation, and application of a method for assessing the viability of *Escherichia coli* for flow cytometry

Anna S. Kazakova[1]✉, Alina N. Afanaseva[1], Anastasia A. Evreiskaya[1], Artur D. Akino[1], Arina K. Zenkova[1], Valeria B. Saparova[1], Zukhra R. Khasanshina[1, 2], Maria D. Bochkareva[1], Roman V. Drai[1]

[1] Closed Joint-Stock Company "Pharm-Holding". 34-A, Svyazi str., Strelna settlement, Saint-Petersburg, 198515, Russia
[2] ITMO University. 49A, Kronverksky prospekt, Saint-Petersburg, 197101, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna S. Kazakova. **E-mail:** anna.kazakova@geropharm.com

ORCID: Anna S. Kazakova – https://orcid.org/0000-0002-5983-4080;
Alina N. Afanaseva – https://orcid.org/0000-0002-1443-4294;
Anastasia A. Evreiskaya – https://orcid.org/0009-0004-0137-8467;
Artur D. Akino – https://orcid.org/0000-0001-6516-7184;
Arina K. Zenkova – https://orcid.org/0009-0001-5183-6874;
Valeria B. Saparova – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
Zukhra R. Khasanshina – https://orcid.org/0000-0002-0065-1853;
Maria D. Bochkareva – https://orcid.org/0009-0001-1489-2957;
Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Received: 22.07.2025 **Accepted:** 30.01.2026 **Published:** 30.01.2026

Abstract

Introduction. About 30 % of genetically engineered therapeutic proteins are produced in *Escherichia coli*. In the production of these proteins, cell viability is one of the key factors determining process efficiency and product quality. Controlling viability is essential when creating cell banks and optimizing *E. coli* cultivation conditions. Changes in cultivation parameters can affect viability and lead to shifts in the proportions of viable cells, dead cells, and cells undergoing apoptosis-like death (ALD). Flow cytometry is one method used to assess viability and distinguish between different cell populations.

Aim. To develop, validate and test a methodology for assessing the viability of *E. coli* using flow cytometry.

Materials and methods. To assess cell viability, we stained *E. coli* with propidium iodide (PI) and annexin V-FITC (An-V-FITC). We identified populations of live, dead, and ALD cells using dual staining with PI and An-V-FITC. The method was validated in accordance with the State Pharmacopoeia, the Decision of the EEC Council No. 85 dated 03.11.2016, and ICH guidelines. We evaluated the method's applicability in developing conditions for cell bank creation and cultivation.

Results and discussion. We developed a method for assessing the viability of *E. coli* cells using flow cytometry and dual staining with PI and An-V-FITC, which enables the identification of live, dead, and ALD cell populations. Validation results demonstrated that the method meets the criteria: specificity (6 %), linearity ($R^2 > 0.9$), accuracy (97–102 %), the limit of quantification (confirmed, 117 %), repeatability (1–10 %), intra-laboratory precision (2–17 %), analytical range (6.4–100 %). In selecting optimal conditions for cell bank creation, viability assessment enabled us to determine the optimal ratio of culture fluid to cryoprotectant (3 : 1) at an optical density of $OD_{600} = 15$, resulting in over 97 % viable cells after cryopreservation. During strain cultivation process development, the method facilitated the selection of optimal conditions. In the bioreactor, the proportion of dead cells increased by only 2.5 %, and the proportion of ALD cells increased by 7 % after 8 hours of induction.

Conclusion. We developed and validated a methodology for assessing *E. coli* viability that can be used during the development and production of therapeutic products.

Keywords: pharmaceutical development, flow cytometry, viability of prokaryotic cells, *E. coli*, validation of a method

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 S. Kazakova, Artur D. Akino, Maria D. Bochkareva, and Zukhra R. Khasanshina developed the methodology and experimental plans. Anna S. Kazakova, Anastasia A. Evreiskaya, and Arina K. Zenkova conducted the experiments. Alina N. Afanasyeva and Valeria B. Saparova participated in selecting validation parameters and processing validation data. Anna S. Kazakova, Zukhra R. Khasanshina, and Maria D. Bochkareva contributed to writing the manuscript. Roman V. Drai supervised the work. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. This study was supported by LLC "GEROPHARM". The sponsor had no influence on the study's conduct or interpretation of the results.

For citation: Kazakova A. S., Afanaseva A. N., Evreiskaya A. A., Akino A. D., Zenkova A. K., Saparova V. B., Khasanshina Z. R., Bochkareva M. D., Drai R. V. Development, validation, and application of a method for assessing the viability of *Escherichia coli* for flow cytometry. *Drug development & registration*. 2026;15(1):124–134. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ALD (apoptosis-like death) – апоптозоподобная гибель;
An-V (annexin V) – аннексин V;
CV (variation coefficient) – коэффициент вариации;
FITC (Fluorescein Isothiocyanate) – флуоресцеинизотиоцианат;
ICH (International Council on Harmonisation) – Международный совет по гармонизации;
SD (Standard Deviation) – стандартное отклонение;
PI – пропидия йодид;
PE (Phycoerythrin) – фикоэритрин;
ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия;
КОЕ – колониеобразующая единица;
НПКО – нижний предел количественного определения;
ПКО – предел количественного определения.

ВВЕДЕНИЕ

Жизнеспособность – один из ключевых параметров при работе со штаммами – продуцентами рекомбинантных белков. Она особенно важна при создании банков клеток *Escherichia coli*, а также при разработке и масштабировании условий их культивирования. Снижение жизнеспособности штамма-продуцента напрямую влияет на качество продукта и стабильность процесса. Согласно решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 77[1] и рекомендациям ICH Q5[2], необходим регулярный мониторинг жизнеспособности клеток в банках для обеспечения их качества и стабильности.

При разработке условий культивирования важно оперативно выявлять изменения в состоянии клеток. При снижении жизнеспособности клеток, вызванной такими факторами, как недостаточная аэрация в биореакторе, накопление токсичных метаболитов, возможно проводить корректирующие действия в реальном времени и тем самым улучшать выход целевого продукта, стабильность и воспроизводимость процесса [1].

Решение данных задач требует надежной, воспроизводимой и технологически применимой методики оценки жизнеспособности клеток *E. coli*. Одним из используемых стандартных методов является подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ)[3,4]. Несмотря на свою простоту, он имеет ряд недостатков: невозможность быстро оценить жизнеспособность, так как требуется время для роста колоний [2], а также недостаточную точность подсчетов [3]. В качестве альтернативного метода, позволяющего быстро и надежно проанализировать жизнеспособность каж-

[1] Согласно решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/documents/306/2586/ Ссылка активна на 29.05.2025.

[2] European Medicines Agency. ICH Guidelines. Available at: https://www.ich.org/page/ich-guidelines. Accessed: 29.05.2025.

[3] International Organization for Standardization. ISO 4833-1:2013. Available at: https://www.iso.org/standard/53728.html. Accessed: 29.05.2025.

[4] ASTM F2944-20. Standard Practice for Automated Colony Forming Unit (CFU) Assays – Image Acquisition and Analysis Method for Enumerating and Characterizing Cells and Colonies in Culture. Available at: https://store.astm.org/f2944-20.html. Accessed: 29.05.2025.

дой клетки, возможно использовать проточную цитометрию [4].

В ряде научных статей описывали оценку жизнеспособности микроорганизмов с использованием проточной цитометрии с флуоресцентными красителями для разных задач: проверки антимикробной активности [5], определения эффективности стерилизации в медицине [6], дезинфекции в пищевой промышленности [7], обнаружения антибактериального потенциала жидкостей в металлообработке [8]. Однако в настоящее время не описана валидированная методика оценки жизнеспособности клеток *E. coli* методом проточной цитометрии для применения в фармацевтической разработке.

Для оценки жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии чаще всего используют двойную окраску флуоресцирующими агентами [9, 10, 11]. Пропидия йодид (PI) является одним из наиболее используемых интеркалирующих флуоресцентных красителей для детектирования мертвых клеток, который селективно связывается с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами при нарушении целостности клеточной мембраны и не проникает через интактные мембраны жизнеспособных клеток [10, 11]. В сочетании с PI для выявления промежуточного состояния жизнеспособности клеток описано использование аннексина V-FITC (An-V-FITC), который связывается с фосфатидилсерином, перемещающимся из внутреннего во внешний слой клеточной мембраны при запуске апоптозоподобной гибели [12, 13].

Анализ жизнеспособности с помощью PI и An-V-FITC обычно проводится на эукариотических клетках [12], но эта комбинация может быть использована и для оценки жизнеспособности *E. coli*, что было продемонстрировано несколькими авторами [14, 15]. Несмотря на то, что классический механизм апоптоза характерен для эукариот, у прокариотических клеток, включая *E. coli*, описана апоптозоподобная гибель (ALD), сопровождающаяся экспозицией фосфатидилсерина и другими маркерами контролируемой клеточной гибели [16–21]. В ряде исследований показано, что использование двойной окраски PI и An-V-FITC позволяет достоверно дифференцировать бактериальные популяции с нарушением мембранной асимметрии и целостности оболочки, что коррелирует с функциональной потерей жизнеспособности [15, 19, 22]. Таким образом, этот метод позволяет различать субпопуляции прокариотических клеток – живые, в процессе ALD и мертвые, что делает его инструментом для оценки жизнеспособности, а не специфическим тестом на апоптоз.

Согласно требованиям регуляторных органов и международным рекомендациям, для использования методики на этапе разработки терапевтических препаратов и получения достоверных, надежных и воспроизводимых результатов необходимо валидировать методику[1, 2, 3].

Таким образом, **цель работы** заключалась в разработке и валидации методики оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием метода проточной цитометрии, а также ее апробации в рамках фармацевтической разработки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм и условия культивирования. Для оценки жизнеспособности использовали *E. coli*, штамм BL21 (кат. № C2530H, New England Biolabs, США), который засевали в 50 мл среды Luria-Bertani [23], растили в шейкере-инкубаторе Ecotron (INFORS HT, Швейцария) при 37 °C около 18 ч при перемешивании со скоростью 180 об/мин. При $OD_{600} = 2 \pm 0{,}2$ отбирали 2 мл пробы суспензии клеток, центрифугировали 10 мин при 4200 g, супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 100 мкл воды очищенной стерильной.

Окрашивание клеток. Окраска для оценки жизнеспособности проводилась согласно рекомендациям производителя. Для окраски An-V-FITC (кат. № 640945, BioLegend, США) и PI (кат. № P4170, Sigma-Aldrich, США) к 100 мкл суспензии клеток в воде добавляли 100 мкл аннексинсвязывающего буфера (кат. № 422201, BioLegend, США), 2 мкл An-V-FITC и 8 мкл PI (1 мг/мл), инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. После инкубирования пробу центрифугировали 10 мин при 4200 g, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл воды очищенной стерильной.

Подготовка контролей для проточной цитометрии. В качестве положительного контроля (~100 % живые клетки) использовали необработанную суспензию клеток, отбираемую на стадии логарифмического роста в оптимальных условиях культивирования. Для получения отрицательного контроля (~100 % мертвые клетки) к 100 мкл суспензии клеток добавляли 900 мкл 99%-го изопропилового спирта, инкубировали 60 мин при комнатной температуре при перемешивании. Для валидации методики пробы отрицательного и положительного контролей смешивали для получения значений жизнеспособности: 1,024; 2,56; 6,4; 10; 16; 40; 70; 100 %.

[1] Guidance document. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics. Accessed: 29.05.2025.

[2] Bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline. Accessed: 29.05.2025.

[3] Russia State Pharmacopoeia. Available at: https://pharmacopoeia.ru/en/russian-pharmacopoeia/ Accessed: 29.05.2025.

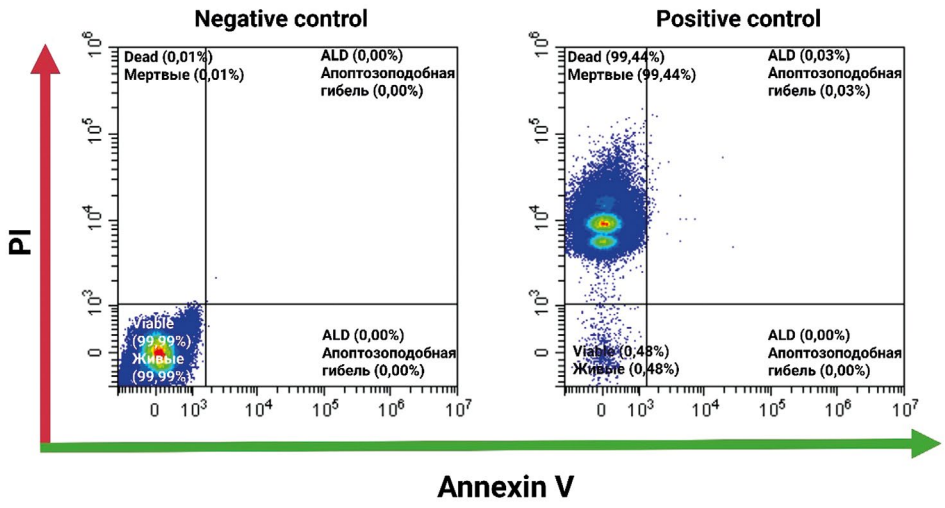


Рисунок 1. Двухпараметровый точечный график PI-PE против An-V-FITC: отрицательный и положительный контроли

Figure 1. Two-parameter PI-PE vs. An-V-FITC dot plot: positive and negative controls

Анализ образцов на проточном цитометре. Образцы анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США), оборудованном тремя диодными лазерами с длинами волн 405, 488 и 638 нм. Детекция флуоресцентного сигнала происходила с использованием стандартной конфигурации прибора (светофильтр 585/42 нм для канала PE и светофильтр 525/40 нм для канала FITC). Коэффициенты усиления фотоумножителя были установлены в логарифмическом режиме для сбора данных о флуоресценции. Настройки напряжения лазеров были выставлены автоматически по результатам калибровки с использованием Daily QC. В каждом анализируемом образце было собрано не менее 100 000 клеток.

Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert (ver. 2.4.0.28, Beckman Coulter, США). На первом этапе анализа с помощью линейных значений интегральных параметров прямого (SSC) и бокового светорассеяния (FSC) была идентифицирована популяция клеток. В пределах общего пула клеток с помощью двухпараметрового графика PI-PE против An-V-FITC были определены PI-положительные, An-V-FITC-положительные, а также дубль-негативные и дубль-позитивные клетки (рисунок 1). Данная стратегия гейтирования позволила определить четыре популяции клеток:

1. Живые (левый нижний квадрант, отрицательный по обоим маркерам).
2. Мертвые (левый верхний квадрант, отрицательный по An-V-FITC и положительный по PI-PE).
3. ранняя ALD/апоптозоподобная гибель (правый нижний квадрант, положительный по An-V-FITC, отрицательный по PI-PE).
4. Поздняя ALD/апоптозоподобная гибель (правый верхний квадрант, положительный по An-V-FITC и PI-PE).

Для подсчета клеток, находящихся в состоянии апоптозоподобной гибели, события из популяций «ранняя ALD» и «поздняя ALD» суммировались. Такое объединение позволяет оценить последовательно развивающиеся стадии апоптозоподобной гибели, характеризующейся экспозицией фосфатидилсерина на поверхности клеточной мембраны [15, 18].

Валидация методики и критерии приемлемости. Параметры валидации выбраны и рассчитаны в соответствии с Государственной фармакопеей[1], решением Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016[2] и рекомендациями ICH[3]. Оценивали следующие параметры: специфичность, нижний предел количественного определения (НПКО), аналитическую область, линейность, правильность, сходимость, внутрилабораторную прецизионность.

Предел количественного определения, линейность и аналитическая область. По результатам первого эксперимента по валидации установлено, что для параметра «правильность» показатель открываемости находится в требуемом диапазоне (100 ± 15 %) при значениях жизнеспособности выше

[1] Russia State Pharmacopoeia. Available at: https://pharmacopoeia.ru/en/russian-pharmacopoeia/ Accessed: 29.05.2025.

[2] Решение Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/documents/306/2592/ Ссылка активна на 29.05.2025.

[3] European Medicines Agency. ICH Guidelines. Available at: https://www.ich.org/page/ich-guidelines. Accessed: 29.05.2025.

6,4 %, поэтому НПКО методики установлен как 6,4 %. Предел количественного определения (ПКО) оценивался для точек: верхней (100 %), средней (40 %), нижней (16 %) и НПКО (6,4 %). НПКО должен не менее чем на 20 % превосходить значение образца с жизнеспособностью 0 %, соответствие этому рассчитывалось как отношение среднего значения флуоресценции при жизнеспособности 0 % к среднему значению флуоресценции НПКО. Линейная зависимость для концентраций с коэффициентом детерминации R2 должна быть не ниже 0,9.

Специфичность рассчитывалась как отношение среднего значения флуоресценции неокрашенного образца к среднему значению флуоресценции образца НПКО. Критерием приемлемости является отсутствие искажающего влияния компонентов холостого образца, сигнал не должен превышать 20 % для анализируемого образца.

Правильность методики характеризуется показателем открываемости, которая рассчитывалась как отклонение среднего результата определений от значения, принимаемого за истинное (номинальное), и выражается в процентах. Для не менее чем 5 повторов одной величины жизнеспособности и не менее чем 4 различных уровней жизнеспособности должен сохраняться разброс от номинальных значений 100 ± 20 %.

Сходимость (повторяемость) методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в один день. При оценке рассматривали пять повторов на пяти уровнях жизнеспособности: НПКО (6,4 %), низком (10 %), ниже среднего (16 %), среднем (40 %) и высоком уровне (70 %). Для не менее чем 5 повторов на менее 4 различных уровнях жизнеспособности должен сохраняться коэффициент вариации (CV) ≤ 15 % и для НПКО – CV ≤ 20 %.

Внутрилабораторная прецизионность характеризуется величиной коэффициента вариации CV, выражаемой в процентах. Ее оценивали в условиях работы одной лаборатории в разные дни. Для образцов не менее чем из 3 проанализированных циклов, проведенных в течение не менее чем 2 различных дней, должен сохраняться CV ≤ 20 %.

Оценка жизнеспособности при создании банков клеток. При подборе условий создания банков клеток оценивали жизнеспособность для соотношений суспензии клеток и криопротектора 1:1, 2:1, 3:1 при оптической плотности суспензии $OD_{600} = 10$ и $OD_{600} = 15$.

Оценка жизнеспособности при разработке условий культивирования. Для проверки применимости методики на этапе разработки условий культивирования анализировали жизнеспособность клеток из биореактора на 0, 2, 4 и 8-й час индукции экспрессии белка.

Таблица 1. Оценка жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии в экспериментах по валидации

Table 1. Assessment of cell viability by flow cytometry in validation experiments

№ пробы Sample number	Живые клетки (не окрашиваются), % Living cells (not stained), %			Мертвые клетки (окрашиваются PI), % Dead cells (stained with PI), %			Значение флуоресценции (PI, PE-A) Fluorescence value (PI, PE-A)		
	№ эксперимента Experiment number								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1. Ожидаемо 6,4 % живые 1. Expected 6.4 % viable	15,42 ± 0,74	13,96 ± 1,84	19,57 ± 0,88	84,52 ± 0,73	85,93 ± 1,85	80,144 ± 0,80	8803,99 ± 288,78	15778,28 ± 200,05	9202 ± 324,74
2. Ожидаемо 10 % живые 2. Expected 10 % viable	–	19,22 ± 1,43	27,40 ± 1,14	–	80,58 ± 1,44	72,152 ± 1,27	–	14316,44 ± 341,37	8313,44 ± 195,61
3. Ожидаемо 16 % живые 3. Expected 16 % viable	31,54 ± 2,67	28,58 ± 0,35	37,25 ± 4,51	68,39 ± 2,66	71,21 ± 0,36	62,24 ± 4,35	6939,85 ± 494,05	12626,44 ± 185,45	7153,38 ± 617,02
4. Ожидаемо 40 % живые 4. Expected 40 % viable	59,77 ± 3,71	56,95 ± 0,77	63,53 ± 1,81	40,12 ± 3,69	42,77 ± 0,74	36,05 ± 1,78	4018,64 ± 447,73	7516,80 ± 247,81	4113,8 ± 180,44
5. Ожидаемо 70 % живые 5. Expected 70 % viable	–	80,35 ± 1,47	88,29 ± 1,06	–	18,77 ± 1,08	11,52 ± 1,00	–	3231,08 ± 320,76	1210,8 ± 103,81
6. Ожидаемо 100 % живые 6. Expected 100 % viable	91,96 ± 0,10	96,27 ± 0,26	96,12 ± 1,17	7,84 ± 0,10	3,07 ± 0,17	3,63 ± 1,24	675,96 ± 36,45	482,28 ± 33,88	437,48 ± 44,31

Статистическая обработка данных проводилась в GraphPad Prism (ver. 9.5.1, GraphPad Software, США). В GraphPad Prism были построены графики линейности, на основании которых определялся коэффициент детерминации R^2. Рассчитывалось стандартное отклонение (SD), коэффициент вариации (CV).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Двухпараметровая флуоресцентная окраска An-V-FITC и PI позволила достоверно разделять популяции живых, апоптозоподобных и мертвых клеток *E. coli*. Пример показан на рисунке 1. При анализе *E. coli* были выявлены клетки, которые реагировали на повреждения по механизму запрограммированной клеточной гибели, имеющей черты эукариотического апоптоза, поэтому они относятся к группе клеток с апоптозоподобной гибелью [18, 22, 24].

По итогам разработки методики была проведена ее валидация, данные из экспериментов по среднему значению с указанием стандартного отклонения показаны в таблице 1.

Специфичность. Расчет специфичности представлен в таблице 2. Ответ соответствовал 6 % сигнала для исследуемого образца, что согласуется с критериями приемлемости менее 20 %.

Предел количественного определения, линейность и аналитическая область. Сигнал анализируемого вещества из образца с НПКО превосходит величину сигнала образца с 0 % жизнеспособностью на 117 %, что удовлетворяет критерию приемлемости (>20 %) (таблица 3).

Аналитическая область определяется в линейном диапазоне 6,4–100 % живых клеток (таблица 4).

Таблица 2. **Специфичность**

Table 2. **Specificity**

100 % жизнеспособные клетки 100 % viable cells	**Флуоресценция** Fluorescence					**Неокрашенные / окрашенные · 100 %** Unstained / Stained · 100 %
Окрашенные Stained	522,1	445,7	514,5	465,1	464,0	6 %
Неокрашенные Unstained	32,5	23,2	24,8	–	–	

Коэффициент детерминации R^2 выше 0,9, что соответствует критериям приемлемости для линейности (таблица 5, рисунок 2).

Таблица 5. **Линейность**

Table 5. **Linearity**

№ эксперимента Experiment number	R^2
1	0,9633
2	0,9905
3	0,9906

Правильность методики находится в диапазоне от 97 до 102 %, что удовлетворяет критериям приемлемости 100 ± 20 % (таблица 6).

Результаты по параметру **сходимость** находятся в диапазоне от 1 до 10 %, что удовлетворяет критерию приемлемости CV ≤ 15 % (таблица 7).

Таблица 3. **Предел количественного определения**

Table 3. **The limit of quantification**

Жизнеспособность, % Viability, %	**Флуоресценция** Fluorescence					**(НПКО/ХП) · 100 %** (LLQD/BS) · 100 %
6,40 (НПКО) 6,40 (LLQD) lower limit of quantitative determination	15600,8	15676,9	15741	16119,3	15753,4	117 %
0 (холостая проба) 0 (BS) Blank sample	18823,4	15651,2	19449	19189,7	18810,6	

Таблица 4. **Аналитическая область**

Table 4. **Analytical area**

Жизнеспособность, % Viability, %	**Найденные значения жизнеспособности по флуоресценции** Calculated fluorescence viability values					**Открываемость, %** Recoverability, %
100	95,6	95,4	94,9	93,5	97,0	105
40	39,9	36,7	35,5	37,9	38,0	106
16,0	14,3	22,1	14,1	14,3	17,9	97
6,4	7,6	7,3	6,0	5,5	3,6	107

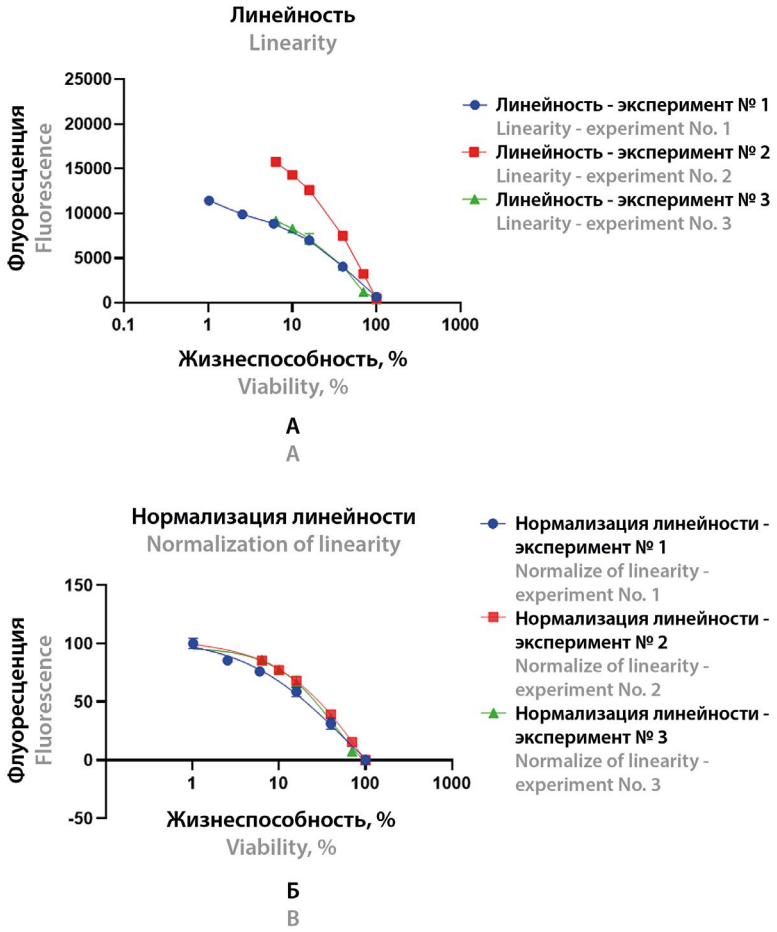


Рисунок 2. **Графики линейности (А) и нормализованной линейности (Б), показывающие зависимость флуоресценции от жизнеспособности**

Figure 2. **Graphs of linearity (A) and normalize of linearity (B) showing the dependence of fluorescence on viability**

Таблица 6. **Правильность**

Table 6. **Accuracy**

Жизнеспособность, % Viability, %	**Найденные значения жизнеспособности по флуоресценции** Calculated fluorescence viability values					**Открываемость, %** Recoverability, %
100	99,06	99,98	99,15	99,75	99,77	100
70	72,80	72,51	65,99	72,18	70,68	99
40	40,09	40,06	37,45	39,06	43,06	100
16,0	17,04	15,25	15,68	15,83	15,74	101
10,00	9,80	11,84	9,04	10,48	10,52	97
6,400	6,70	6,50	6,34	5,39	6,31	102

Таблица 7. **Сходимость**

Table 7. **Repeatability**

Жизнеспособность, % Viability, %	**Флуоресценция** Fluorescence					**CV, %**
70	3010,7	3041,4	3781,8	3077,6	3243,9	10
40	7223,2	7430,8	7436	7887,6	7606,4	3
16	12313,6	12808,4	12690,1	12648,2	12671,9	1
10	14489,2	13826,6	14751,5	14264,5	14250,4	2
6,4	15600,8	15676,9	15741	16119,3	15753,4	1

Таблица 8. Внутрилабораторная прецизионность
Table 8. Intra-laboratory precision

Дата Date	07.03.2024				28.03.2024				26.04.2024				CV, %
Исполнитель Analyst	№ 1				№ 1				№ 2				
Жизнеспособность, % Viability, %	Эксперимент № 1 Experiment No. 1				Эксперимент № 2 Experiment No. 2				Эксперимент № 3 Experiment No. 3				
100	91,76	92,00	91,92	91,86	91,92	95,91	96,46	96,08	96,43	96,47	96,60	96,60	94,10	96,18	97,10	2
40	61,16	56,42	59,03	56,75	66,06	57,51	57,58	57,06	55,66	56,92	65,41	62,80	60,74	64,28	64,40	6
16	28,33	31,37	35,67	30,76	32,26	29,15	28,65	28,48	28,42	28,22	32,16	42,82	37,33	33,50	40,46	14
6,4	16,5	15,48	15,93	14,88	14,49	17,13	13,11	12,9	13,99	12,66	20,18	20,67	18,43	19,40	19,15	17

Результаты по параметру **внутрилабораторная прецизионность** находятся в диапазоне от 2 до 17 %, что удовлетворяет критериям приемлемости CV ≤ 20 % (таблица 8).

Оценка жизнеспособности при создании банков клеток. Разработанная методика была использована в процессе оптимизации криоконсервации банков клеток штаммов-продуцентов *E. coli*. Проводилась оценка влияния оптической плотности и соотношения объемов клеточной суспензии и криопротектора при закладке банков в среде с химически определенным составом среды при дефиците питательных веществ. В качестве целевого показателя жизнеспособности при разморозке принимали значение 95 % жизнеспособных клеток.

По итогам оптимизации выбраны условия, обеспечивающие более 97 % жизнеспособных клеток после выхода из криоконсервации, а также определены границы нормы показателя в спецификациях для оценки банков клеток в процессе закладки и контроля стабильности во время их хранения. Оптимальные условия достигнуты при оптической плотности суспензии перед замораживанием $OD_{600} = 15$, соотношении объемов культуральной жидкости и криопротектора 3 к 1 (таблица 9).

Таблица 9. Процент живых и мертвых клеток после криоконсервации

Table 9. Percentage of living and dead cells after cryopreservation

Значения о.е. суспензии при OD_{600} Values of o.u. suspensions at OD_{600}	Соотношение суспензии клеток и криопротектора The ratio of cell suspension and cryoprotectant	Живые, % Viable, %	Мертвые, % Dead, %
10	1:1	94,94 ± 0,22	4,83 ± 0,24
	2:1	92,41 ± 0,31	7,45 ± 0,30
	3:1	95,07 ± 0,15	4,81 ± 0,14
15	1:1	93,79 ± 0,15	6,17 ± 0,14
	2:1	97,24 ± 0,05	2,70 ± 0,04
	3:1	96,57 ± 0,07	3,41 ± 0,06

Оценка жизнеспособности при разработке условий культивирования. Методика была использована в процессе разработки условий культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* в скрининговых биореакторах Multifors 2 (INFORS HT, Швейцария). Жизнеспособность клеток в итоговом процессе культивирования представлена на рисунке 3.

Оценка жизнеспособности показана с момента индукции экспрессии белка в связи с тем, что именно в этот период возможно наиболее критичное снижение жизнеспособности клеток. По графику видно, что за 8 ч индукции процент жизнеспособных клеток сни-

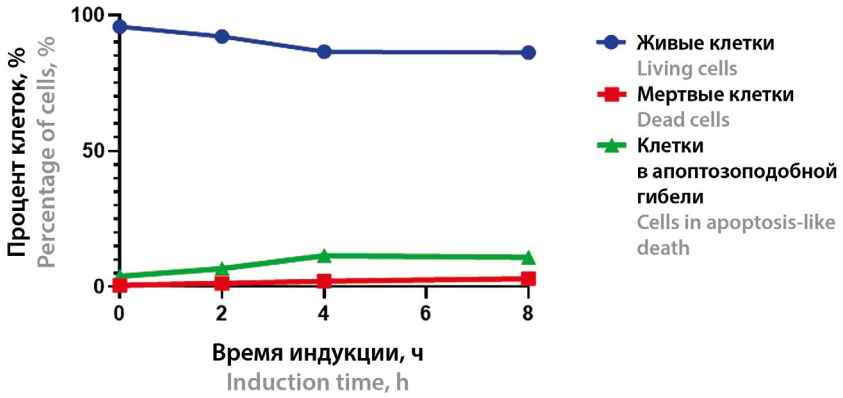


Рисунок 3. Диаграммы жизнеспособности клеток в зависимости от времени индукции при культивировании в биореакторе

Figure 3. Graphs showing the dependence of cell viability on induction time during cultivation in a bioreactor

зился с 95,7 до 86,2 %, процент мертвых увеличился с 0,5 до 2,9 %, в ALD – с 3,9 и до 10,9 %. В данном эксперименте при оптимальных условиях культивирования с 4-го часа индукции процент клеток всех популяций стабилизировался и достиг плато.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием проточной цитометрии и окрашивания клеток пропидия йодидом и аннексином V. Проведена валидация методики по параметрам «сходимость», «линейность», «специфичность», «правильность», «предел количественного определения», «аналитическая область», «внутрилабораторная прецизионность». Результаты валидационных испытаний находятся в рамках критериев приемлемости. Методика показала свою эффективность для оценки жизнеспособности клеток при создании банков клеток *E. coli*. Контроль жизнеспособности позволяет своевременно выявлять и устранять причины снижения качества клеточных банков, что критично для обеспечения воспроизводимости и эффективности производства рекомбинантных белков. Внедрение методики на этапах разработки технологии культивирования дало возможность оперативно принимать корректирующие меры в процессе культивирования, что способствует стабильности технологического процесса и повышению выхода целевого продукта.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rösner L. S., Walter F., Ude C., John G. T., Beutel S. Sensors and Techniques for On-Line Determination of Cell Viability in Bioprocess Monitoring. *Bioengineering*. 2022;9(12):762. DOI: 10.3390/bioengineering9120762.
2. Meyer C. T., Lynch G. K., Stamo D. F., Miller E. J., Chatterjee A., Kralj J. M. A high-throughput and low-waste viability assay for microbes. *Nature Microbiology*. 2023;8(12):2304–2314. DOI: 10.1038/s41564-023-01513-9.
3. Martini K. M., Boddu S. S., Nemenman I., Vega N. M. Maximum likelihood estimators for colony-forming units. *Microbiology Spectrum*. 2024;12:e03946-23. DOI: 10.1128/spectrum.03946-23.
4. Śliwa-Dominiak J., Czechowska K., Blanco A., Sielatycka K., Radaczyńska M., Skonieczna-Żydecka K., Marlicz W., Łoniewski I. Flow Cytometry in Microbiology: A Review of the Current State in Microbiome Research, Probiotics, and Industrial Manufacturing. *Cytometry Part A*. 2025;107(3):145–164. DOI: 10.1002/cyto.a.24920.
5. Agus R., Avino F., Lavrikova A., Myers B., Furno I. Flow cytometry study of *Escherichia coli* treated with plasma-activated water: confirming the absence of the viable but non-culturable state in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2025;16:1592471. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1592471.
6. McEvoy B., Lynch M., Rowan N. J. Opportunities for the application of real-time bacterial cell analysis using flow cytometry for the advancement of sterilization microbiology. *Journal of Applied Microbiology*. 2021;130(6):1794–1812. DOI: 10.1111/jam.14876.
7. Teixeira P., Fernandes B., Silva A. M., Dias N., Azeredo J. Evaluation by Flow Cytometry of Escherichia coli Viability in Lettuce after Disinfection. *Antibiotics*. 2020;9(1):14. DOI: 10.3390/antibiotics9010014.
8. Vanhauteghem D., Audenaert K., Demeyere K., Hoogendoorn F., Janssens G. P. J., Meyer E. Flow cytometry, a powerful novel tool to rapidly assess bacterial viability in metal working fluids: Proof-of-principle. *PLoS ONE*. 2019;14(2):e0211583. DOI: 10.1371/journal.pone.0211583.
9. Ou F., McGoverin C., Swift S., Vanholsbeeck F. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123(2):464–477. DOI: 10.1111/jam.13508.
10. Davey H., Guyot S. Estimation of Microbial Viability Using Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. 2020;93(1):e72. DOI: 10.1002/cpcy.72.
11. Léonard L., Chibane L. B., Bouhedda B. O., Degraeve P., Oulahal N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1225. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01225.

12. Lakshmanan I., Batra S. K. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *BIO-PROTOCOL*. 2013;3(6):e374. DOI: 10.21769/bioprotoc.374.
13. Rieger A. M., Nelson K. L., Konowalchuk J. D., Barreda D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(50):2597. DOI: 10.3791/2597.
14. Han G., Lee D. G. Antibacterial Mode of Action of β-Amyrin Promotes Apoptosis-Like Death in *Escherichia coli* by Producing Reactive Oxygen Species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;32(12):1547–1552. DOI: 10.4014/jmb.2209.09040.
15. Lai M.-J., Huang Y.-W., Chen H.-C., Tsao L.-I., Chang Chien C.-F., Singh B., Liu B. R. Effect of Size and Concentration of Copper Nanoparticles on the Antimicrobial Activity in Escherichia coli through Multiple Mechanisms. *Nanomaterials*. 2022;12(21):3715. DOI: 10.3390/nano12213715.
16. Dwyer D. J., Camacho D. M., Kohanski M. A., Callura J. M., Collins J. J. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Molecular Cell*. 2012;46(5):561–572. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.04.027.
17. Erental A., Sharon I., Engelberg-Kulka H. Two programmed cell death systems in Escherichia coli: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway. *PLoS Biology*. 2012;10(3):e1001281. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001281.
18. Kwun M. S., Lee D. G. Bacterial Apoptosis-Like Death through Accumulation of Reactive Oxygen Species by Quercetin in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024;34(7):1395–1400. DOI: 10.4014/jmb.2403.03057.
19. Lin S., Lin Z., Zhou F., Wang D., Zheng B., Hu J. Polyoxometalate $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$ Inactivates *Escherichia coli* O157:H7 by Inducing recA Expression and Apoptosis-like Bacterial Death. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(14):11469. DOI: 10.3390/ijms241411469.
20. Choi H., Hwang J.-S., Lee D. G. Coprisin exerts antibacterial effects by inducing apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *IUBMB Life*. 2016;68(1):72-8. DOI: 10.1002/iub.1463.
21. Li J., Ma L., Liao X., Liu D., Lu X., Chen S., Ye X., Ding T. Ultrasound-Induced *Escherichia coli* O157:H7 Cell Death Exhibits Physical Disruption and Biochemical Apoptosis. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2486. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02486.
22. Chen B., Zhao Y., Li Z., Pan J., Wu H., Qiu G., Feng C., Wei C. Immobilization of Phosphatidylserine by Ethanol and Lysozyme on the Cell Surface for Evaluation of Apoptosis-Like Decay in Activated-Sludge Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(14):e00345-20. DOI: 10.1128/AEM.00345-20.
23. Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(23):8746–8749. DOI: 10.1128/JB.01368-07.
24. Erental A., Kalderon Z., Saada A., Smith Y., Engelberg-Kulka H. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. *mBio*. 2014;5(4):e01426-14. DOI: 10.1128/mBio.01426-14.

Оригинальная статья / Research article

UDK 615.322; 582.272.7; 543.062

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2189

Check for updates

CC BY 4.0

Validation of Folin – Ciocalteu assay for phlorotannins analysis in fresh and storm-cast brown algae *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae)

Ekaterina D. Obluchinskaya[1], Olga N. Pozharitskaya[1], Anna V. Daurtseva[1], Alexander N. Shikov[1, 2] ✉

[1] Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (MMBI KSC RAS). 17, Vladimirskaya str., Murmansk, 183038, Russia

[2] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexander N. Shikov. **E-mail:** spb.pharmacy@gmail.com

ORCID: Ekaterina D. Obluchinskaya – https://orcid.org/0000-0003-4456-656X;
Olga N. Pozharitskaya – https://orcid.org/0000-0003-1061-0665;
Anna V. Daurtseva – https://orcid.org/0000-0001-6653-5452;
Alexander N. Shikov – https://orcid.org/0000-0003-4351-0695.

Received: 23.09.2025 **Accepted:** 09.12.2025 **Published:** 06.02.2026

Abstract

Introduction. Phlorotannins are secondary metabolites produced mainly by brown seaweeds and belong to the class of polyphenolic compounds with diverse bioactivities. Storm-cast brown algae, a problem for coastal biocenoses, may be a valuable source of polyphenols. The Folin-Ciocalteu reagent (FCR) is the most commonly used for the quantification of total polyphenols in natural samples. Different spectrophotometric methods with FCR for the determination of phlorotannins in algae have been described in the literature.

Aim. The primary aim of this study is to standardize and validate the spec-trophotometric determination of total phlorotannins using FCR and demonstrate its applicability to analysis of storm-cast and fresh algae.

Materials and methods. *A. nodosum* samples were collected in sheltered beach on the Olenitsa Bay (66°27'15.7"N 35°18'20.4" E), Kandalaksha Gulf (White Sea, Russia) on two tidal levels: one located at low tide at a depth of 0.6–1.0 m (fresh) and the second was located at the supralittoral in the zone of wave splashing (storm-cast). Field sampling was carried out between June and September. The cleaned seaweed were transported to the laboratory, washed accu-rately with clean water, freeze-dried, ground into powder. Functional groups present in the algae were identified using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. Spectrophotometric determination of total phlorotannins content (TPhC) with FCR was used and validated according to national and international guidelines.

Results and discussion. The optimum conditions for analysis time, wave-length, and standard substance were 45 min, 750 nm, and phloroglucinol, respec-tively. Under these conditions, validation by UV/Vis spectrophotometry proved the method to be linear ($R^2 > 0.99$), specific, precise, accurate, reproducible, robust, and easy to perform. The limit of detection and limit of quantification were 0.005 and 0.02 mg/mL, respectively. For precision analysis, an intra-day test (RSD 2.16 %) and an inter-day test (RSD 2.84 %) were performed. Matrix effect assessment demonstrated that this had a negligible effect (1.9 %) on the phlorotannins quantification. TPhC in storm-cast algae ranged from 59 to 101 mg/g, while freshly collected algae were statistically significantly higher ($p < 0.01$) and ranged from 71 to 135 mg/g. Maximum accumulation of phlorotannins in *A. nodosum* was observed between July and August, after which a decrease was observed.

Conclusion. Results of current study could be utilised for routine analysis of TPhC in brown algae and storm-cast seaweed using optimized spectrophotometric method with FCR on readily available low-cost equipment in most laboratories to provide rapid. This methodology complies with the requirements for pharmaceutical analysis to ensure the reliability of results during pharmaceutical development and routine control both in fresh and storm-cast of *A. nodosum*.

Keywords: Brown algae, storm-cast, methodology optimization, total phlorotannins, UV/Vis spectrophotometric, validation, Folin-Ciocalteu

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 D. Obluchinskaya – study design, sample extraction and analysis, data processing. Olga N. Pozharitskaya – study design, analysis and interpretation of data, review of publications. Anna V. Daurtseva – sample extraction and analysis. Alexander N. Shikov – validation, data curation. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

© Obluchinskaya E. D., Pozharitskaya O. N., Daurtseva A. V., Shikov A. N., 2026
© Облучинская Е. Д., Пожарицкая О. Н., Даурцева А. В., Шиков А. Н., 2026

Funding. Russian Scientific Foundation, grant No. 25-24-20166 (https://rscf.ru/en/project/25-24-20166) and Ministry of Education and Science of the Murmansk Region, Agreement No. 30-2025-001243 (State registration № 124013000732-7), funded this research.

Acknowledgment. Authors thanks Elena Gorshenina for technical assistance.

For citation: Obluchinskaya E. D., Pozharitskaya O. N., Daurtseva A. V., Shikov A. N. Validation of Folin – Ciocalteu assay for phlorotannins analysis in fresh and storm-cast brown algae *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Drug development & registration*. 2026;15(1):135–144. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2189

Валидация метода Фолина – Чокальтеу для анализа флоротаннинов в свежих и штормовых выбросах бурых водорослях *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae)

Е. Д. Облучинская[1], О. Н. Пожарицкая[1], А. В. Даурцева[1], А. Н. Шиков[1, 2]✉

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук (ФГБУН ММБИ РАН). 183038, Россия, г. Мурманск, ул. Владимирская, д. 17
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

✉ **Контактное лицо:** Шиков Александр Николаевич. **E-mail:** spb.pharmacy@gmail.com

ORCID: Е. Д. Облучинская – https://orcid.org/0000-0003-4456-656X;
О. Н. Пожарицкая – https://orcid.org/0000-0003-1061-0665;
А. В. Даурцева – https://orcid.org/0000-0001-6653-5452;
А. Н. Шиков – https://orcid.org/0000-0003-4351-0695.

Статья поступила: 23.09.2025 **Статья принята в печать:** 09.12.2025 **Статья опубликована:** 06.02.2026

Резюме

Введение. Флоротанины, являющиеся вторичными метаболитами, в основном вырабатываются бурыми морскими водорослями и относятся к классу полифенольных соединений, обладающих разнообразной биологической активностью. Бурые водоросли, выбрасываемые на берег штормом и составляющие угрозу для прибрежных экосистем, могут стать ценным источником полифенолов. Для количественного определения общего содержания полифенолов в природных образцах чаще всего применяется реактив Фолина – Чокальтеу (FCR).

Цель. Основной целью данного исследования является стандартизация и валидация спектрофотометрического определения общего содержания флоротаннинов с использованием FCR и демонстрация его применимости для анализа выброшенных штормом и свежих водорослей.

Материалы и методы. Образцы *A. nodosum* были собраны на защищенном пляже губы Оленица (66°27'15.7" с.ш. 35°18'20.4" в.д.) Кандалакшского залива (Белое море, Россия) на двух приливных уровнях: один находился во время отлива на глубине 0,6–1,0 м (свежие водоросли), а второй – на супралиторали в зоне заплеска волн (водоросли из штормовых выбросов). Полевой отбор проб проводился в период с июня по сентябрь. Очищенные водоросли доставляли в лабораторию, тщательно промывали чистой водой, лиофильно высушивали и измельчались в порошок. Функциональные группы, присутствующие в водорослях, идентифицировались с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИК-Фурье). Спектрофотометрический метод с использованием реактива Фолина – Чокальтеу оптимизирован для анализа свежих и выброшенных штормом бурых водорослей и валидирован в соответствии с национальными и международными рекомендациями.

Результаты и обсуждение. Оптимальными условиями для анализа были время анализа, длина волны и стандартное вещество: 45 мин, 750 нм и флороглюцин, соответственно. В этих условиях валидация методики спектрофотометрии показала, что метод линейный ($R^2 > 0,99$), специфичный, точный, достоверный, воспроизводимый, надежный и простой в применении. Предел обнаружения и предел количественного определения составили 0,005 и 0,02 мг/мл, соответственно. Внутридневная (RSD 2,16 %) и междневная (RSD 2,84 %) прецизионность анализа была рассчитана. Оценка влияния матрицы показала, что она оказывает незначительное влияние (1,9 %) на количественное определение флоротаннинов. Содержание флоротаннинов в водорослях, выброшенных штормом, варьировалось от 59 до 101 мг/г, в то время как в свежесобранных водорослях было статистически достоверно выше ($p < 0.01$) и варьировалось от 71 до 135 мг/г. Максимальное накопление флоротаннинов в *A. nodosum* наблюдалось в период с июля по август, после чего наблюдалось снижение.

Заключение. Полученные в ходе данного исследования результаты могут быть применены для регулярного анализа содержания флоротаннинов в бурых водорослях и водорослях, извлеченных из штормовых отходов. Это возможно благодаря оптимизированному спектрофотометрическому методу с использованием реактива Фолина – Чокальтеу, который основывается на применении доступного и недорогого оборудования, имеющегося в большинстве лабораторий, что обеспечивает оперативность анализа. Данная методология соответствует требованиям фармацевтического анализа, обеспечивая надежность результатов при разработке лекарственных препаратов и рутинном контроле как свежего, так и штормовых выбросов *A. nodosum*.

Ключевые слова: бурые водоросли, штормовые выбросы, оптимизация методологии, общие флоротаннины, УФ-видимая спектрофотометрия, валидация, метод Фолина – Чокальтеу

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

Вклад авторов. Е. Д. Облучинская – дизайн исследования, отбор и анализ образцов, обработка данных. О. Н. Пожарицкая – дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, обзор публикаций. А. В. Даурцева – отбор и анализ образцов. А. Н. Шиков – валидация, курирование данных. Все авторы принимали участие в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Финансирование. Российский научный фонд, грант № 25-24-20166 (https://rscf.ru/project/25-24-20166), и Министерство образования и науки Мурманской области, соглашение № 30-2025-001243 (государственный регистрационный номер 124013000732-7), финансировали данное исследование.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Елене Горшениной за техническую помощь.

Для цитирования: Облучинская Е. Д., Пожарицкая О. Н., Даурцева А. В., Шиков А. Н. Валидация метода Фолина – Чокальтеу для анализа флоротаннинов в свежих и штормовых выбросах бурых водорослях *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):135–144. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2189

INTRODUCTION

Brown algae (Phaeophyceae) represent a category of algae that are extensively found in polar and temperate regions, predominantly thriving at depths ranging from 6 to 30 meters, and they exhibit significant potential for growth and utilization[1]. These algae are rich in a range of bioactive compounds such as polysaccharides, proteins, amino acids, polyphenols, terpenes, mannitol, fucoxanthin, hormones, and other active substances. Notably, phlorotannins represent a distinct category of polyphenolic compounds that are primarily found in brown seaweeds [1]. Phlorotannins show medical, cosmetic, and biotechnological applications [2]. Significant amount of seaweed biomass accumulate along the coasts as a result of storms, winds, and ocean currents. The accumulation of storm-cast of seaweeds on the beaches causes unpleasant odors and greenhouse gas emissions. This seaweed holds the potential to be harnessed as biomass for the extraction of functional ingredients, which could facilitate the advancement of innovative biotechnological applications [3]. Although the relative phenolic composition of macroalgae changes significantly during aging and decay after they are washed ashore [4], is noted that most of the current information in the scientific literature on phenolic levels in algae is derived from live tissue analyses. Data on the polyphenol content of storm-cast algae are limited and no previous studies have been conducted in Arctic seas.

The extraction of phlorotannins has gained significant importance due to their biological activities and extensive range of applications. The literature indicates that there is no standardized or unified approach for the extraction of phlorotannin [5]. However, various methods have been employed to extract it from macroalgae, including the following: Solvent extraction, enzymatic extraction, hydrothermal extraction, supercritical fluid extraction, microwave-assisted extraction, ultrasonic-assisted extraction, and deep eutectic-based solvent extraction. Solvent extraction, also referred to as solid–liquid extraction, involves the removal of a solute from a solid matrix using a liquid solvent. This method is a well-established technique frequently employed to isolate various compounds from biological matrices or for quantification purposes. It is particularly regarded as the most widely used and efficient approach for extracting phlorotannins from macroalgae. A range of solvents, including ethanol, methanol, acetone, hexane, and their combinations, are utilized in this extraction process [6].

Various methods are employed to assess the total polyphenolic content in algae, including nuclear magnetic resonance [7], high-performance liquid chromatography [8], and particularly optical techniques [9], etc. [10, 11]. Among these, the spectrophotometric method utilizing Folin-Ciocalteu reagent (FCR) is one of the most commonly used and simplest approaches for determining total phlorotannins [12]. The underlying principle involves the oxidation of phenolic compounds in an alkaline environment using molybdenum and tungsten phosphates, resulting in the formation of a

[1] Listing the World's Algae. Available at: http://www.algaebase.org. Accessed: 22.07.2025.

blue-colored complex. The intensity of this blue tungsten-molybdenum complex with polyphenols is quantitatively assessed spectrophotometrically at a wavelength of 750 nm. This method has undergone numerous modifications over time, with the approach introduced by Singleton and Rossi in 1965 being the most commonly employed for the analysis of total polyphenols [13]. Several other authors [12] reported and proposed modification of this method.

The primary aim of this study is to unify and validate the spectrophotometric determination of total phlorotannins using FCR and demonstrate its applicability to analysis of storm-cast and fresh algae.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Chemicals

FCR, sodium carbonate anhydrous, and phloroglucinol were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All other analytical-grade chemicals and solvents were received from local chemical suppliers. Ultrapure water was purified using a Milli-Q system (Millipore, USA).

Algal material

A. nodosum samples were collected in sheltered beach on the Olenitsa Bay (66°27'15.7"N 35°18'20.4" E), Kandalaksha Gulf (White Sea, Russia) on two tidal levels: one located at low tide at a depth of 0.6–1.0 m (fresh) and the second was located at the supralittoral in the zone of wave splashing (storm-cast). Field sampling was carried out between June and September. The cleaned seaweed were transported to the laboratory, then cleaned of epiphytes, sediment particles, and other contaminants, washed with tap water, and freeze-dryied in Inei-4 freeze dryer (IBF RAS, Russia). The dried seaweed was ground using a non-metallic mill (CT 293 Cyclotec, Foss, Danmark) and sieved through 1.0 mm. All samples were stored at –25 °C until the experiment.

Characterization of the algae samples

The Fourier–Transform Infrared Spectroscopy (FT–IR) spectra of dried and ground algal material without additional preparation were recorded using the Perkin–Elmer® Spectrum™ 3 spectrometer (Perkin Elmer Inc., USA) in mid-IR mode, equipped with a Universal ATR (attenuated total reflectance) sampling device containing diamond/ZnSe crystal. Triplicates of each sample were averaged.

Extraction of Phlorotannins

0.5 grams of algae samples was suspended in 5 ml of 70 % acetone and subjected to continuous shaking in a 360-degree rotating shaker (Bio RS-24 BioSan, Latvia) for one hour et 4–6 °C. Following this, the mixture was centrifuged for 10 minutes at 3200 rpm and 6 °C (C1015R Centurion Scientific, United Kingdom). The supernatant was then collected, and an additional 5 ml of 70 % acetone was added to the remaining solid residue. This extraction process was repeated four times. After the fourth extraction, the supernatants from each step were combined, and the acetone was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The resultant extract with phlorotannins was freeze-dried and stored in a freezer [14].

Pre-Method Standardization for Determination of TPhC

During the optimization and standardization of the spectrophotometric method utilizing the FCR, five critical parameters were evaluated: (1) reaction kinetics, (2) wavelength of maximum absorption, (3) the standard that best represents algal phlorotannins, (4) the amount of alkaline additive, and (5) the order in which reagents are added. The employed method was a colorimetric assay, adapted from a general protocol established by Singleton and Rossi [13], with minor modifications. A 2 % sodium carbonate solution (SCS) in 0.1 M NaOH was utilized. Spectra were recorded using a 1 cm quartz cell on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Japan) over a period of 5 to 120 minutes following the addition of the SCS, across a wavelength range of 400–850 nm. Ultrapure water was used as a blank.

The method was validated for specificity, linearity, analytical range, accuracy, precision, and limit of quantification (LOQ) as recommended[1, 2].

The fresh *A. nodosum* and its storm-cast were extracted with 70 % acetone according [14]. The freeze-dried extracts were dissolved and analyzed for phlorotannins content. The matrix effect (%ME) was calculated to determine the influence of the seaweed matrix on the extraction of phlorotannins [Eq. 1, 15]. The applicability of the validated methodology was assessed on fresh seaweed samples and storm-washed seaweed samples collected from the beach. All samples were analyzed in triplicate in all tests performed.

Statistical Analysis

The analysis of the data was conducted using STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) through one-way analysis of variance (ANOVA) accompanied by Tukey's test, with a significance level set at $P < 0.05$. Results are presented as mean standard deviation (SD) [or relative standard deviation (RSD, %)].

[1] Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf. Accessed: 22.07.2025.

[2] ICH guideline Q2 (R1) «Validation of analytical procedures: Text and methodology». Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf. Accessed: 22.07.2025.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the algae samples by FT–IR

Figure 1 shows the infrared absorbance spectra of the raw fresh and storm-cast algal biomass. They are very similar since no modification occurs on the type and amount of functional groups present on the algae surface.

The FT-IR spectrum provided a detailed fingerprint of the molecular components, revealing several characteristic peaks. A broad band observed at 3390 cm^{-1} was attributed to O—H stretching vibrations, indicative of hydrogen-bonded alcohol and phenol groups [16]. This peak is significant as it confirms the presence of phenolic compounds, which are known for their antioxidant properties. The occurrence of two bands in the 1800–1600 cm^{-1} range signifies the existence of a carbonyl group in two variants: as a carboxylic acid ester (C double bond O) at 1743 cm^{-1} and as a carboxylate anion (—COO—) at 1611 cm^{-1}, thereby validating the presence of alginic acid [17]. Four weak peaks appeared between 1500 and 1562 cm^{-1}, and their presence is ascribed to bending vibrations of N—H in protein amide II and stretching vibrations of C—N. Likewise, a medium-intensity peak was observed at 1611 cm^{-1}, indicating the stretching vibrations of C═O from protein amide [18]. The peak at 1408 cm^{-1} corresponds to the deformation of the C—OH vibration, along with the contribution from the O—C—O symmetric stretching vibration of the carboxylate group [18]. The peaks at 1229 cm^{-1} (S=O stretching) and 814 cm^{-1} (C—S—O) are attributed to sulphate groups, which are typically present in fucoidan and other sulphated polysaccharide elements of the cell wall in brown seaweeds [17]. Consequently, the primary groups of chemical compounds found in the cell wall of both fresh and storm-cast macro-algae *A. nodosum* are phenolic compounds, carbohydrates, and polysaccharides. The FT–IR analysis clearly shows that although the strength of absorption bands might differ, their positions stay the same.

Pre-Method Standardization for Determination of TPhC

After the pre-method standardization step for the FC assay, all other experiments were performed by (1) setting the wavelength at 750 nm for analysis; (2) using phloroglucinol as the reference compound to be used as the analytical standard for TPhC quantification; (3) setting the reaction time in 45 min; (4) the initial introduction of SCS into the reaction medium; and (5) optimum amount of 2 % SCS in 0.1 M NaOH.

Methodology validation

The specificity of the method was demonstrated by comparing the UV spectra (after the reaction with the FCR) of the test solution (0.2 mg/mL), the solution of the standard sample of phloroglucinol (1 mg/mL), the test solution with the addition of the standard (0.2 mg/mL + 5 µL 1 mg/mL) and the blank (Figure 2).

The calibration equation obtained for phloroglucinol presented a linear response for the analyzed con-

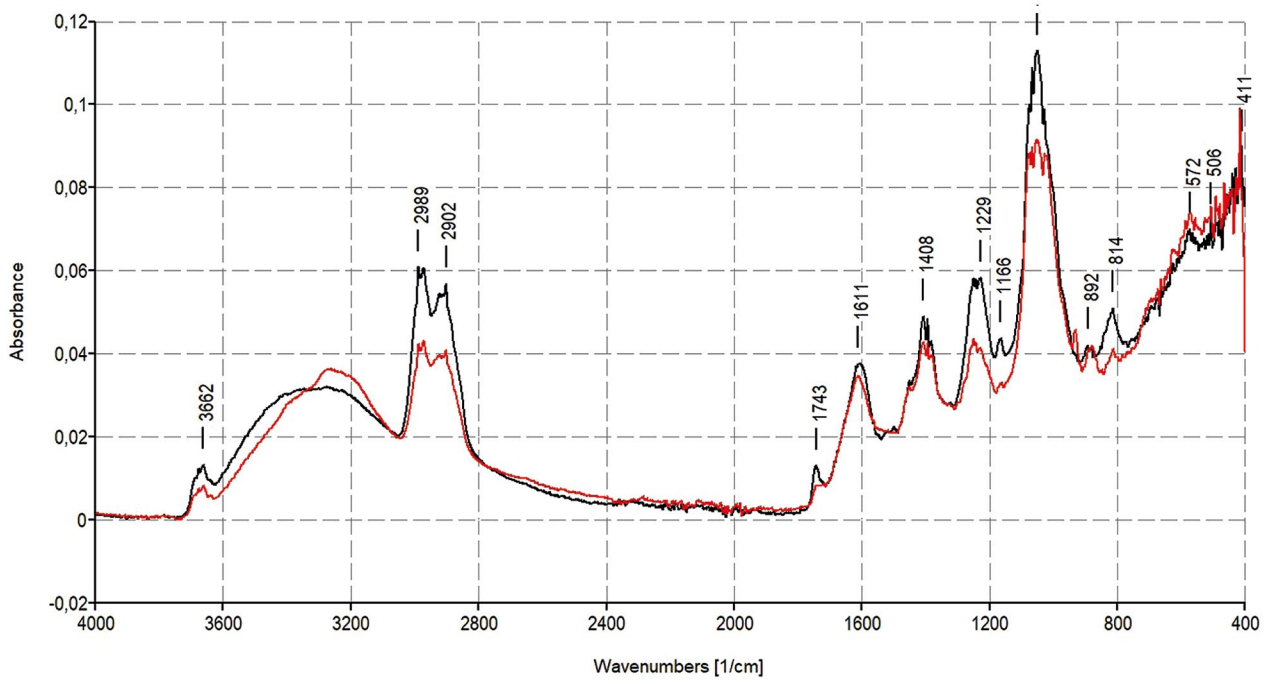


Figure 1. FT–IR spectra of the fresh and storm-cast algal biomass *A. nodosum*: black line – fresh algae; red line – storm-cast algae

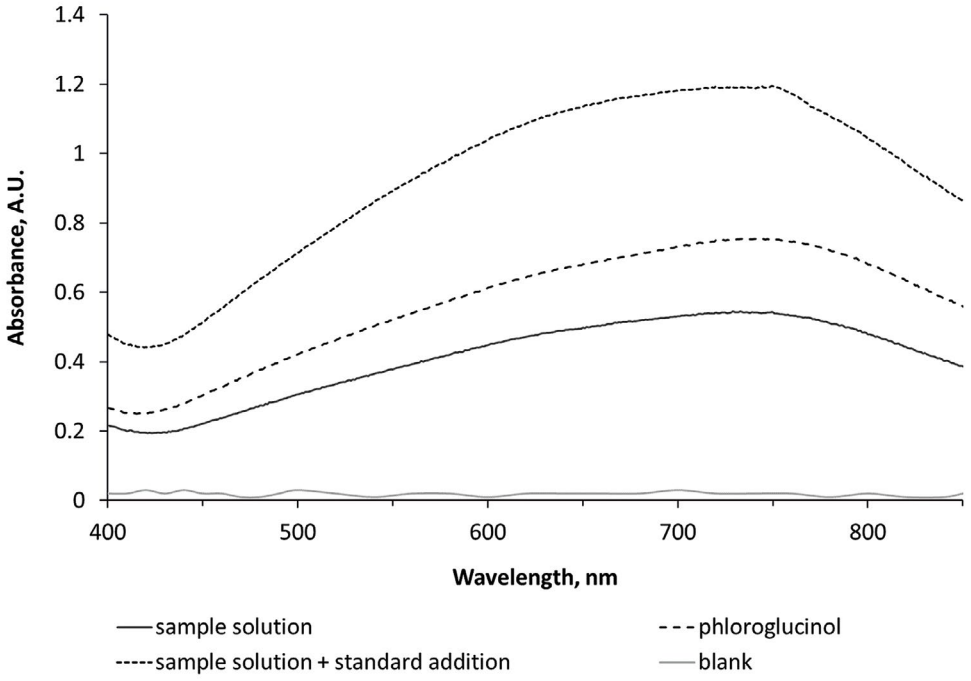


Figure 2. The typical absorption profile of reference compound phloroglucinol, sample solution *A. nodosum* extract (with and without additives) and the blank in the wavelength range of 400–850 nm

centration range with RSD lower than 1.5 % for all points (Figure 3, A). Also, the coefficient of determination R^2 0.9992 satisfies the requirement, which stipulates that the R^2 has to be more than 0.99.

To determine the linearity, aliquots of the stock solution (algae extract) were diluted to the final concentrations of 0.005–0.25 mg/mL. The linearity curve, shown in Fig. 3B, was plotted with five consecutive concentration points (0.04–0.16 mg/mL) chosen to result in an absorption range between 0.4 and 0.8 A.U. The value of R^2 (0.9926) assures the linearity of the adapted method for the evaluated range of concentrations.

The effect of the matrix within algal extracts can be assessed by analyzing the linearity and selectivity curves, as the intricate nature of the matrix complicates the separation of analytes from the raw material. If the linearity and selectivity curves run parallel to one another, the method is deemed to be selective [19, 20].

According to, the extract concentration of 0.02 mg/mL, corresponding to the lowest point on the calibration curve (Figure 3, B), was adopted as the limit of quantification (LOQ). Detection limit is the minimum content of the substance being determined in the sample, the signal from which can be reliably distinguished from the background. The experimentally obtained detection limit for the algae extract in the reaction with the FCR was 0.005 mg/mL**.**

Precision was assessed at two levels: repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). The results, expressed in percentage of TPhC in the algae sample (±SD [RSD(%)]), were 59.2 ± 1.28 (2.16) and 58.7 ± 1.67 (2.84) for repeatability and intermediate precision, respectively. These values were tested and found statistically equal since the obtained F value (1.69) is lower than the F critical (5.05). The matrix effect was calculated to determine the interaction that seaweed matrix has on TPhC using FC assessment, and showed that its variability did not exceed 1.9 %.

Reproducibility. The same sample of *A. nodosum* storm-cast seaweeds was extracted and analyzed six times, and the measured absorbance values were recorded. The calculated RSD (CV) was 2.28 %, which indicated that the experiment had high reproducibility.

To assess the accuracy of the FC assay, samples with different raw material weights were used. According to the results, comparable results are obtained at all three concentration levels of the analyzed solution, and the relative standard deviation does not exceed 4 %, which corresponds to the RSD value optimal for quantitative determination.

To confirm the effectiveness of the modified FC assay protocol in minimizing the interference of the algae matrix, additional analyses were also conducted using a standard additional method (SAM), where the actual samples are used to construct the calibration curve individually. The principal advantage of this method is that it allows a matrix effect correction, since the same matrix is present in the calibration standards and the sample [21].

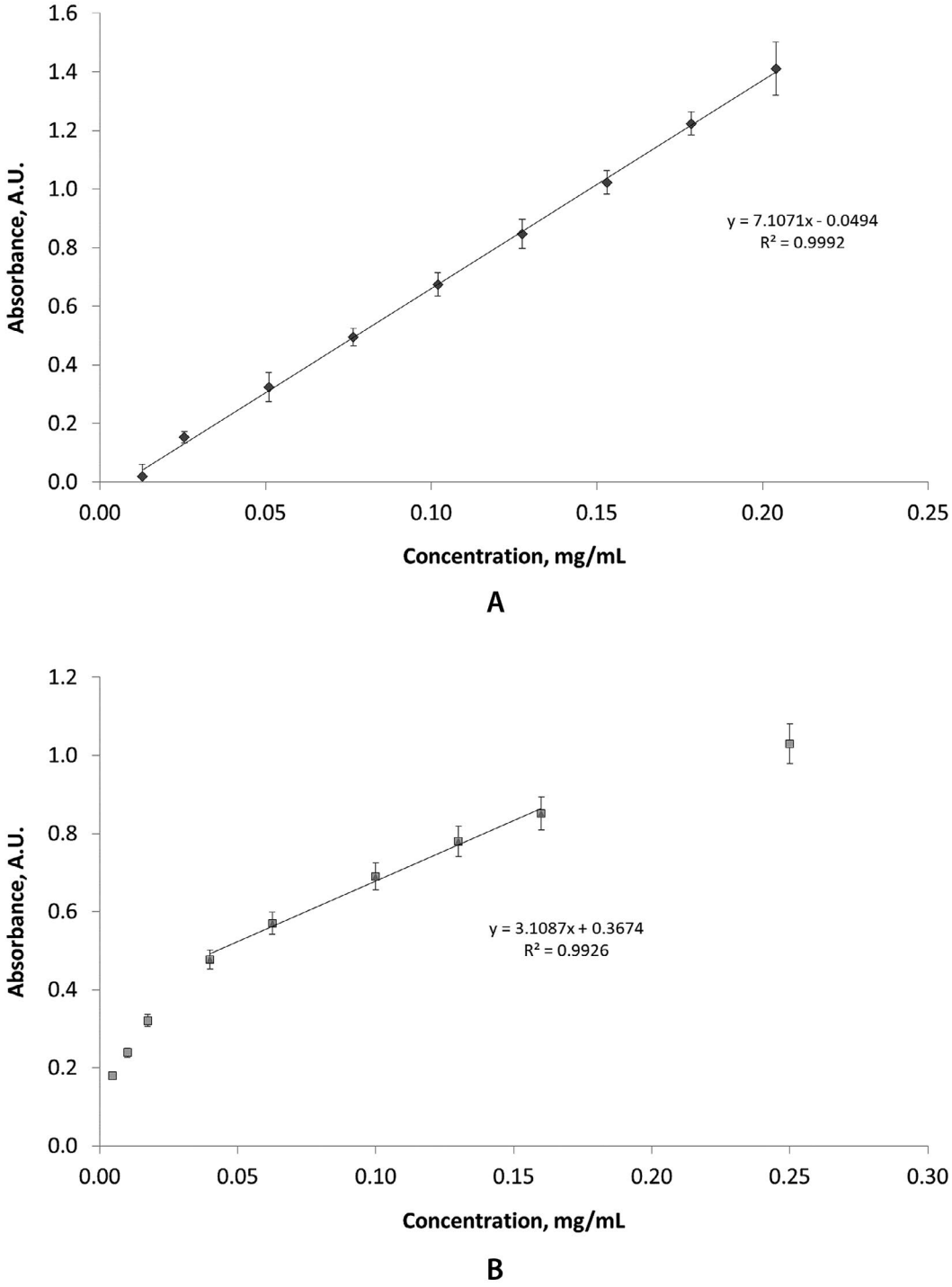


Figure 3. **(A) Calibration curve obtained with the phloroglucinol standard for the analysis of TPhC; (B) Linearity curve of *A. nodosum* extract from storm-cast seaweeds**

Method applicability

The completeness of extraction was estimated using multiple extractions [14, 22]. The effect of the number of consecutive extractions on the phlorotannins content of the algae is demonstrated in Figure 4. Exhaustive extraction of TPhC is provided after seven consecutive cycles.

Notable that after four cycles the yield of TPhC is 97.8 and 98.8 % for seaweeds and storm-cast seaweeds, respectively (Figure 4). Therefore, we suggest to use four consecutive extractions for quantitative analysis of TPhC.

Despite the growing interest in the use of storm-cast seaweeds, there are no studies on their phlorotannin content compared to freshly collected seaweed at low

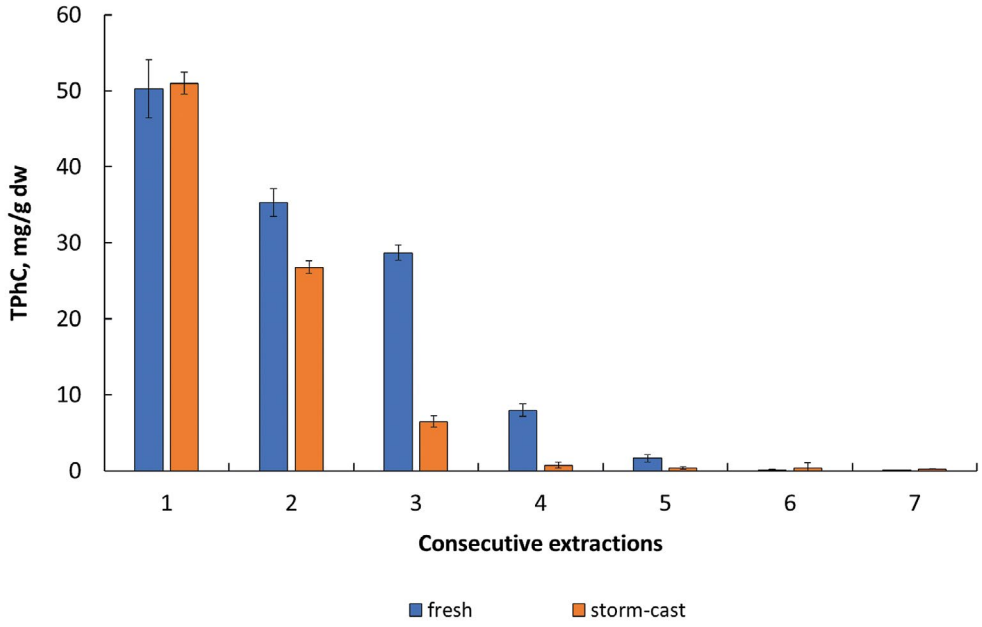


Figure 4. **Consecutive extractions of brown algae and storm-cast seaweed in 70 % acetone and 4–6 °C**

tide. In this study, we determined the TPhC in samples collected from the White Sea coast between June and September. The results are presented in Figure 5. The TPhC of storm-cast seaweeds ranged from 59 to 101 mg/g. TPhC of freshly collected seaweed was statistically higher and ranged from 71 to 135 mg/g. The maximum accumulation of phlorotannins was observed in fresh samples during the period July-August, followed by a decrease (Figure 5).

In current experiments, a significantly high amount of phlorotannins was found in freshly collected algae compared with storm-blown algae. According to literature data, the maximum content of polyphenols in species from this geographic zone does not exceed 12 % of dw [23]. An increase in polyphenols is noted in July–August. TPhC of *A. nodosum* from storm-cast in our studies reached 10 % dw in September and did not differ from that in fresh algae. The dynamics of the phlo-

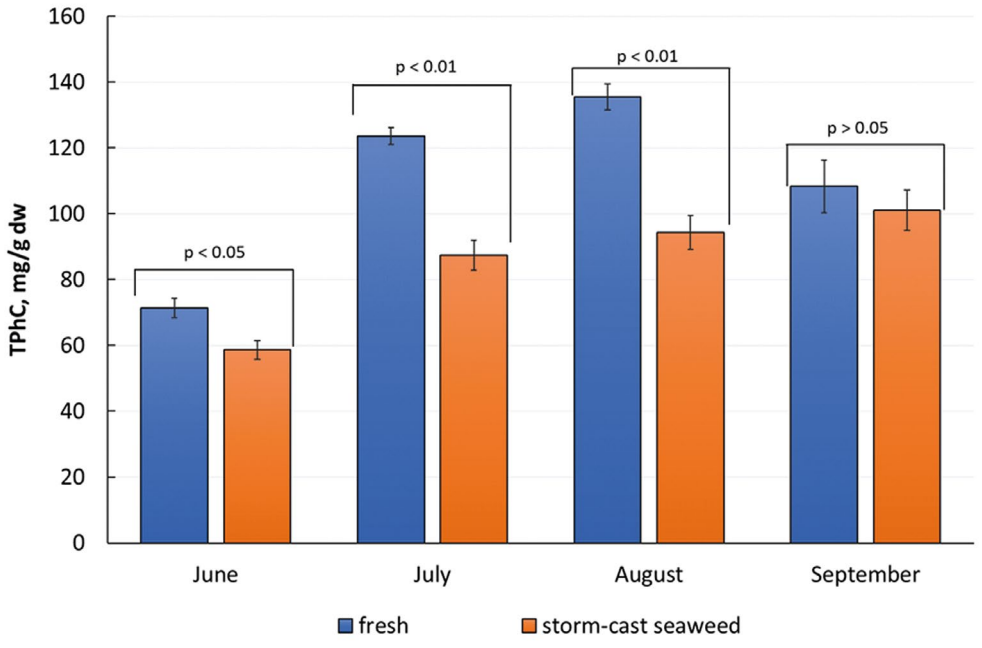


Figure 5. **Dynamics of TPhC in fresh and storm-cast algal biomass *A. nodosum***

rotannins content in storm-cast algae is not so pronounced. Polyphenolic compounds serve as protective agents against various biotic and abiotic stressors, including grazing, bacterial infection, UV radiation, and metal contamination [24]. In perennial algae like *A. nodosum*, seasonal fluctuations in chemical composition are frequently observed and correlate with physiological changes in vegetative thalli [25]. Given the potential applications of both freshly harvested and storm-cast *A. nodosum* in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries, it is essential to identify the optimal times for algal material collection. Research conducted by Parys et al. [26], Apostolidis et al. [27], and Tabassum et al. [28] has highlighted notable seasonal variations in the polyphenol content of *A. nodosum*. Specifically, Apostolidis et al. [27] and Bogolitsyn et al. [23] documented analogous seasonal trends in phenolic compounds, indicating peak concentrations in June and July, while May exhibited the lowest levels. The variations in polyphenol content can be influenced by factors such as geographical location, light intensity, temperature, salinity, and the availability of surrounding nutrients [26].

A study on *A. nodosum* highlighted a significant interaction between UVB radiation and the emersion or immersion of plants: phenol levels were higher in thalli alternately emerged and immersed, and, thus, directly exposed to UV radiation for a few hours [29]. Changes in polyphenol content also correlate with the reproductive stage of *A. nodosum* from the Arctic [30]. The results of this work showed for the first time that *A. nodosum* collected from storm discharges showed a certain tendency to preserve the phlorotannin content compared to fresh seaweed. The average phenolic content of seaweeds' sediments from the beaches of the NW coast of Spain was around ~2 % dw, which is below the results for *A. nodosum* from White sea in 10 times lower [31]. These average values were similar to those measured in previous studies [22, 32]. Similar studies support the feasibility of processing Arctic seaweed storm emissions to produce polyphenols. This study confirms the feasibility of collecting and recycling Arctic algae from storm-cast seaweeds for polyphenol production.

CONCLUSION

The results showed that the spectrophotometric method remains a reliable method for the rapid determination of phlorotannins in algae samples. The Folin – Ciocalteu method has been optimized for the first time for the analysis of polyphenols in brown algae and the storm seaweed *Ascophyllum nodosum*. The 45-minute reaction time was shown to be similar to the 120-minute reaction time in the original method, reducing analysis time and increasing throughput. Furthermore, the optimized Folin–Ciocalteu method demonstrated good linearity, accuracy, and stability, confirming its suitability for the determination of total phlorotannins in algae. The matrix effect of both fresh and discarded algae was found to be negligible (1.9 %) and did not significantly affect the quantification of phlorotannins. External validation, supported by SAM, proved extremely useful in determining the accuracy of various pretreatment methods for PP quantification. Application of the optimized method to simultaneously collected fresh and storm seaweed *A. nodosum* allowed us to evaluate the characteristic polyphenol content and its seasonal variability. Our data suggest that July–August may be the optimal period for collecting *A. nodosum* material with high phlorotannin content (more than 10 %). Ascophyllum from storm seaweed from the White Sea demonstrated significantly higher polyphenol levels than other previously analyzed seaweeds from other seas. The results of this study can be used for routine analysis of polyphenol content in both brown and storm seaweed using the optimized Folin – Ciocalteu assay.

REFERENCES

1. Zheng H., Zhao Y., Guo L. A bioactive substance derived from brown seaweeds: Phlorotannins. *Marine Drugs*. 2022;20(12):742. DOI: 10.3390/md20120742.
2. Duan X., Agar O. T., Barrow C. J., Dunshea F. R., Suleria H. A. Improving potential strategies for biological activities of phlorotannins derived from seaweeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2025;65(5):833–855. DOI: 10.1080/10408398.2023.2282669.
3. Harb T. B., Chow F. An overview of beach-cast seaweeds: Potential and opportunities for the valorization of underused waste biomass. *Algal Research*. 2022;62:102643. DOI: 10.1016/j.algal.2022.102643.
4. Lastra M., López J., Neves G. Algal decay, temperature and body size influencing trophic behaviour of wrack consumers in Sandy beaches. *Marine Biology*. 2015;162:221–233. DOI: 10.1007/s00227-014-2562-z.
5. Meng W., Mu T., Sun H., Garcia-Vaquero M. Phlorotannins: A review of extraction methods, structural characteristics, bioactivities, bioavailability, and future trends. *Algal Research*. 2021;60:102484. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102484.
6. Santos S. A. O., Félix R., Pais A. C. S., Rocha S. M., Silvestre A. J. D. The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of extraction and identification methodologies. *Biomolecules*. 2019;9(12):847. DOI: 10.3390/biom9120847.
7. Wekre M. E., Hellesen Brunvoll S., Jordheim M. Advancing quantification methods for polyphenols in brown seaweeds—applying a selective qNMR method compared with the TPC assay. *Phytochemical Analysis*. 2022;33(7):1099–1110. DOI: 10.1002/pca.3162.
8. Obluchinskaya E. D., Pozharitskaya O. N., Shevyrin V. A., Kovaleva E. G., Flisyuk E. V., Shikov A. N. Optimization of extraction of phlorotannins from the Arctic *Fucus vesiculosus* using natural deep eutectic solvents and their HPLC profiling with tandem high-resolution mass spectrometry. *Marine Drugs*. 2023;21(5):263. DOI: 10.3390/md21050263.
9. Torrisi L., Genovese G., Spagnuolo D., Lombardo D., Torrisi A., Cutroneo M. Highly visible photoluminescence in biocompatible liquids obtained by rehydration of *Saccharina latissima* algae at room temperature. *Optical Materials*. 2025;13:117245. DOI: 10.1016/j.optmat.2025.117245.

10. Najibi A., Gondo T. F., Turner C. A review of analytical techniques for characterizing phlorotannins in brown seaweeds: Current challenges and future prospects. *Algal Research*. 2025;20:104105. DOI: 10.1016/j.algal.2025.104105.
11. Bogolitsyn K., Druzhinina A., Kaplitsin P., Ovchinnikov D., Parshina A., Kuznetsova M. Relationship between radical scavenging activity and polymolecular properties of brown algae polyphenols. *Chemical Papers*. 2019;73:2377–2385. DOI: 10.1007/s11696-019-00760-7.
12. Torres P., Osaki S., Silveira E., dos Santos D. Y., Chow F. Comprehensive evaluation of Folin-Ciocalteu assay for total phenolic quantification in algae (Chlorophyta, Phaeophyceae, and Rhodophyta). *Algal Research*. 2024;80:103503. DOI: 10.1016/j.algal.2024.103503.
13. Stengel D., Connan S. Natural products from marine algae. Methods in molecular biology. New York: Humana Press; 2015. 439 p. DOI: 10.1007/978-1-4939-2684-8.
14. Koivikko R., Loponen J., Honkanen T., Jormalainen V. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*. 2005;31:195–212. DOI: 10.1007/s10886-005-0984-2.
15. Nunes N., Valente S., Ferraz S., Barreto M. C., de Carvalho M. P. Validation of a spectrophotometric methodology for a rapid iodine analysis in algae and seaweed casts. *Algal Research*. 2019;42:101613. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101613.
16. Karthik R., Manigandan V., Sheeba R., Saravanan R., Rajesh P. R. Structural characterization and comparative biomedical properties of phloroglucinol from Indian brown seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28(6):3561–3573. DOI: 10.1007/s10811-016-0851-2.
17. Blanco-Pascual N., Montero M. P., Gómez-Guillén M. C. Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*. 2014;37:100–110. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.021.
18. Leal D., Matsuhiro B., Rossi M., Caruso F. FT–IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*. 2008;343(2):308–316. DOI: 10.1016/j.carres.2007.10.016.
19. Rocha Martins G., Ferreira Monteiro A., Lopes do Amaral F. R., Sant'Ana da Silva A. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58:4693–4702. DOI: 10.1007/s13197-020-04959-5.
20. Morais Galvão M. A., Oliveira de Arruda A., Ferraz Bezerra I. C., Assunção Ferreira M. R., Lira Soares L. A. Evaluation of the Folin-Ciocalteu method and quantification of total tannins in stem barks and pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) LP Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2018;61:e18170586. DOI: 10.1590/1678-4324-2018170586.
21. Vandeginste B. G. M., Rutan S. C. Handbook of chemometrics and qualimetrics. Part A. Amsterdam: Elsevier; 1997. 207 p.
22. Obluchinskaya E. D., Zakharova L. V. Comparative study of polyphenols of brown algae of the Barents sea and the White sea, as well as the waters of the North Atlantic. *Chemistry of plant raw material.* 2020;(4):129–137. DOI: 10.14258/jcprm.2020047755.
23. Bogolitsyn K., Parshina A., Ivanchenko N., Polomarchuk D. Seasonal variations in the chemical composition of Arctic brown macroalgae. *Algal Research*. 2023;72:103112. DOI: 10.1016/j.algal.2023.103112.
24. Stengel D. B., Connan S., Popper Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*. 2011;29(5):483–501. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016.
25. Åberg P., Pavia H. Temporal and multiple scale spatial variation in juvenile and adult abundance of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*. 1997;58:111–119. DOI: 10.3354/meps158111.
26. Parys S., Kehraus S., Pete R., Küpper F. C., Glombitza K.-W., König G. M. Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*. 2009;44(3):331–338. DOI: 10.1080/09670260802578542.
27. Apostolidis E., Karayannakidis P. D., Kwon Y.-I., Lee C. M., Seeram N. P. Seasonal variation of phenolic antioxidant-mediated α-glucosidase inhibition of *Ascophyllum nodosum*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2011;66:313–319. DOI: 10.1007/s11130-011-0250-4.
28. Tabassum M. R., Xia A., Murphy J. D. Seasonal variation of chemical composition and biomethane production from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Bioresource Technology*. 2016;216:219–226. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.071.
29. Pavia H., Brock E. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*. 2000;193:285–294. DOI: 10.3354/meps193285.
30. Obluchinskaya E. D., Pozharitskaya O. N., Gorshenina E. V., Daurtseva A. V., Flisyuk E. V., Generalova Y. E., Terninko I. I., Shikov A. N. *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis from Arctic: Its biochemical composition, antiradical potential, and human health risk. *Marine Drugs*. 2024;22(1):48. DOI: 10.3390/md22010048.
31. Gómez M., Barreiro F., López J., Lastra M. Evaluation of phenolic content of wrack debris on estuarine beaches: The effect on upper beach macrofauna. *Marine Ecology*. 2022;43(1):40–53. DOI: 10.1111/maec.12692.
32. Connan S., Goulard F., Stiger V., Deslandes E., Ar Gall E. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina*. 2004;47:410–416. DOI: 10.1515/BOT.2004.057.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«РЕГУЛЯТОРНАЯ ПРАКТИКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» — «РЕГЛЕК 2026»

Отель «Хаятт Ридженси Москва Петровский Парк»

27–29 апреля 2026 г., Москва

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

27 апреля Сессия 1

Утренняя встреча с экспертом

Пленарный доклад

Секционные заседания

- Вопросы взаимного признания результатов экспертизы. Текущая практика, перспективы унификации экспертных подходов
- «Два молодца одинаковы с лица...». Критические аспекты доказательства эквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов
- Теория и практика оценки соотношения польза-риск при регистрации лекарственных препаратов в ЕАЭС (I часть)
- Решенные и нерешенные вопросы конъюгатов: МАТ, радиофармпрепаты и биспецифики
- «У семи нянек...». Проблема прослеживаемости при регистрации лекарственных препаратов
- «Не пей, козленочком станешь...». Фармаконадзор, как причина внесения изменений в регистрационное досье лекарственного препарата
- Факторы успеха для вывода препаратов будущего

Вечерняя встреча с экспертными организациями государств-членов ЕАЭС

28 апреля Сессия 2

Утренняя встреча с экспертом

Секционные заседания

- Параллельные изменения в регистрационных досье: сложности и проблемные зоны — как их избегать
- Регуляторные инспекции GLP и GCP в системе координат регистрации лекарственных препаратов
- Теория и практика оценки соотношения польза-риск при регистрации лекарственных препаратов в ЕАЭС (II часть)
- «Свет мой, зеркальце! Скажи, да всю правду доложи...». Актуализация документов Союза и функционирование фармацевтического рынка: новые перспективы и новые вызовы
- Обеспечение качества твердых лекарственных форм на этапах их жизненного цикла. Экспертный взгляд (I часть)
- «Мы все учились понемногу чему-нибудь и как-нибудь...». Фармацевтические образовательные программы: цель или средство?

Вечерняя встреча с регуляторами

29 апреля 2026г. Сессия 3

Утренняя встреча с экспертом

Секционные заседания

- Жизнь после 31.12.2025. Приведение регистрационных досье в соответствие в 2026 году: завершающий этап и риски
- От стандартов к стандартизации — чем помочь производителю
- Обеспечение качества жидких лекарственных форм на этапах их жизненного цикла. Экспертный взгляд (II часть)
- «Три мудреца в одном тазу...». Экспертный комитет по лекарственным средствам и его роль в формировании общих экспертных подходов евразийского пространства

Мастер-класс

- Как правильно подготовить ОХЛП и ЛВ: последние регуляторные требования и практические советы

Вечерняя встреча НЦЭСМП и представителей профильных ассоциаций

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

РегЛек

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru и по тел.: (495) 968-49-59, e-mail: fru@fru.ru

Оригинальная статья / Research article

УДК 543.429.23; 543.544.5.068.7 + 543.51; 616.65-002-006

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2217

Check for updates

CC BY 4.0

Анализ полифторсодержащего аналога нестероидного антиандрогена флутамида методами ядерного магнитного резонанса и жидкостной хроматографии

Н. Е. Кузьмина[1], С. В. Алешин[2], С. Л. Кузнецов[2]✉, И. А. Тубашева[2], В. Г. Шуватова[2], М. Б. Сокол[3], Е. Д. Никольская[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»). 123182, Россия, г. Москва, площадь Академика Курчатова, д. 1

[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля» Российской академии наук (ИБХФ РАН). 119334, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

✉ **Контактное лицо:** Кузнецов Сергей Леонидович. **E-mail:** Kuznetsov_SL@nrcki.ru

ORCID: Н. Е. Кузьмина – https://orcid.org/0000-0002-9133-0835;
С. В. Алешин – https://orcid.org/0009-0003-1170-2286;
С. Л. Кузнецов – https://orcid.org/0000-0002-6290-5142;
И. А. Тубашева – https://orcid.org/0000-0002-9461-4219;
В. Г. Шуватова – https://orcid.org/0000-0002-7198-8568;
М. Б. Сокол – https://orcid.org/0000-0002-1976-1972;
Е. Д. Никольская – https://orcid.org/0000-0002-1931-3117.

Статья поступила: 30.10.2025 **Статья принята в печать:** 10.02.2026 **Статья опубликована:** 13.02.2026

Резюме

Введение. В результате поиска более активных в отношении рака простаты полифторсодержащих структурных аналогов нестероидного антиандрогена флутамида был получен ряд соединений, среди которых наибольший интерес для дальнейшего изучения представлял 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил) нонанамид (шифр F-4). Необходимые данные для строгого доказательства строения молекулы данного соединения ранее получены не были. Идентификация примесей и количественная оценка их содержания в субстанции F-4 не проводились. Для решения этих задач нами были использованы методы спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым (ВЭЖХ-УФ) и тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Цель. Комплексный анализ строения соединения F-4 методами ЯМР и ВЭЖХ, а также идентификация и количественная оценка с их помощью содержания примесей в образцах субстанции.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись лабораторные образцы субстанции соединения F-4, полученные ацилированием 4-нитро-3-(трифторметил)анилина хлорангидридом перфторпеларгоновой кислоты известным методом. Для анализа использовали: ЯМР-спектрометр Agilent DD2 NMR System 600; жидкостный хроматограф Agilent 1200, оснащенный диодно-матричным детектором G1315B; жидкостный хроматограф Agilent Infinity II, снабженный масс-спектрометрическим детектором с тройным квадруполем G6495C (Agilent Technologies, США). В обоих хроматографах применялась колонка Luna C18(2), 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США).

Результаты и обсуждение. Структурная интерпретация спектров ^{1}H-, ^{13}C- и ^{19}F-ЯМР образцов соединения F-4, проведенная с учетом значений химических сдвигов сигналов, их мультиплетности и данных 2D-экспериментов, однозначно свидетельствует о том, что F-4 имеет структуру 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил) фенил)нонанамида. В спектрах ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР образцов субстанции F-4 также присутствовали сигналы двух примесных соединений, не относящихся к исходным веществам. Для их разделения был использован метод ВЭЖХ-УФ. С помощью ВЭЖХ-МС/МС при ионизации электроспреем в отрицательном режиме (–ESI) для всех пиков были зафиксированы высокоинтенсивные сигналы *m/z*, характерные для депротонированных молекулярных ионов. Строение обнаруженных примесей было подтверждено методами спектроскопии ЯМР. Результаты количественного определения относительного содержания примесей в образцах субстанции F-4 с применением методов ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР практически совпали, различия между полученными средними значениями статистически не были значимы.

© Кузьмина Н. Е., Алешин С. В., Кузнецов С. Л., Тубашева И. А., Шуватова В. Г., Сокол М. Б., Никольская Е. Д., 2026
© Kuz'mina N. E., Aleshin S. V., Kuznetsov S. L., Tubasheva I. A., Shuvatova V. G., Sokol M. B., Nikolskaya E. D., 2026

Заключение. В результате комплексного исследования методами ЯМР и ВЭЖХ установлено, что соединение F-4 соответствует структуре 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)нонанамида. В образцах субстанции F-4 были идентифицированы две родственные примеси, относительное содержание каждой примеси не превышало 1,7 %.

Ключевые слова: нестероидный антиандроген, флутамид, структурный аналог, ЯМР, ВЭЖХ, родственная примесь

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

Вклад авторов. Н. Е. Кузьмина предложила концепцию исследования и провела анализ образцов целевого соединения методами спектроскопии ЯМР. С. Л. Кузнецов и И. А. Тубашева получали испытуемые образцы. С. В. Алешин, М. Б. Сокол и Е. Д. Никольская анализировали их методами ВЭЖХ. В. Г. Шуватова наряду с другими авторами участвовала в написании текста статьи.

Финансирование. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт». Использовалось оборудование ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ресурсного центра НИЦ «Курчатовский институт» и ИБХФ РАН.

Для цитирования: Кузьмина Н. Е., Алешин С. В., Кузнецов С. Л., Тубашева И. А., Шуватова В. Г., Сокол М. Б., Никольская Е. Д. Анализ полифторсодержащего аналога нестероидного антиандрогена флутамида методами ядерного магнитного резонанса и жидкостной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):146–160. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2217

Analysis of a polyfluorinated analogue of the nonsteroidal antiandrogen flutamide by nuclear magnetic resonance and liquid chromatography

Natal'ya E. Kuz'mina[1], Sergey V. Aleshin[2], Sergey L. Kuznetsov[2]✉, Irina A. Tubasheva[2], Valentina G. Shuvatova[2], Maria B. Sokol[3], Elena D. Nikolskaya[3]

[1] Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. 8/2, Petrovsky bulvar, Moscow, 127051, Russia
[2] National Research Centre "Kurchatov Institute". 1, Ploshchad Academica Kurchatova, Moscow, 123182, Russia
[3] N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences (IBCP RAS). 4, Kosygina str., Moscow, 119334, Russia

✉ **Corresponding author:** Sergey L. Kuznetsov. **E-mail:** Kuznetsov_SL@nrcki.ru

ORCID: Natal'ya E. Kuz'mina – https://orcid.org/0000-0002-9133-0835;
Sergey V. Aleshin – https://orcid.org/0009-0003-1170-2286;
Sergey L. Kuznetsov – https://orcid.org/0000-0002-6290-5142;
Irina A. Tubasheva – https://orcid.org/0000-0002-9461-4219;
Valentina G. Shuvatova – https://orcid.org/0000-0002-7198-8568;
Maria B. Sokol – https://orcid.org/0000-0002-1976-1972;
Elena D. Nikolskaya – https://orcid.org/0000-0002-1931-3117.

Received: 30.10.2025 **Accepted:** 10.02.2026 **Published:** 13.02.2026

Abstract

Introduction. As a result of the search for more active polyfluoro-containing structural analogs of the non-steroidal antiandrogen flutamide against prostate cancer, a number of compounds were obtained, among which 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluoro-*N*-(4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl)nonanamide (code F-4) was of the greatest interest for further study. The necessary data for rigorous proof of the molecular structure of this compound have not previously been obtained. Identification of impurities and quantitative assessment of their content in the F-4 substance have not been conducted. To address these issues, we used nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high-performance liquid chromatography with ultraviolet (HPLC-UV) and tandem mass-selective detection (HPLC-MS/MS).

Aim. Comprehensive analysis of the structure of compound F-4 using NMR and HPLC methods, as well as identification and quantitative assessment using them of the content of impurities in samples of the substance.

Materials and methods. The object of the study were laboratory samples of the substance of compound F-4, obtained by acylation of 4-nitro-3-(trifluoromethyl)aniline with perfluoropelargonic acid chloride using a known method. The following were used for the analysis: NMR spectrometer Agilent DD2 NMR System 600; liquid chromatograph Agilent 1200 equipped with diode array detector G1315B; liquid chromatograph Agilent Infinity II equipped with mass spectrometric detector with triple quadrupole G6495C (Agilent Technologies, USA). Both chromatographs used a column Luna C18(2), 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex, USA).

Results and discussion. Structural interpretation of the ^{1}H, ^{13}C, and ^{19}F NMR spectra of F-4 samples, taking into account the chemical shift values of the signals, their multiplicity, and 2D experimental data, clearly indicates that F-4 has the structure of 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluoro-*N*-(4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl)nonanamide. The ^{1}H and ^{19}F NMR spectra

of the F-4 substance samples also contained signals of two impurity compounds not related to the starting materials. HPLC-UV method was used to separate them. Using HPLC-MS/MS with electrospray ionization in the negative mode (–ESI), high-intensity *m/z* signals characteristic of deprotonated molecular ions were recorded for all peaks. The structure of the detected impurities was confirmed using NMR spectroscopy. The results of quantitative determination of the relative impurity content in samples of F-4 substance using ^{1}H and ^{19}F NMR methods were virtually identical; the differences between the obtained average values were not statistically significant.

Conclusion. A comprehensive study using NMR and HPLC methods revealed that compound F-4 corresponds to the structure of 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluoro-*N*-(4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl)nonanamide. Two related impurities were identified in samples of substance F-4, the relative content of each impurity did not exceed 1.7 %.

Keywords: nonsteroidal antiandrogen, flutamide, structural analogue, NMR, HPLC, related impurity

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. Natal'ya E. Kuz'mina proposed the study concept and analyzed the target compound samples using NMR spectroscopy. Sergey L. Kuznetsov and Irina A. Tubasheva prepared the test samples. Sergey V. Aleshin, Maria B. Sokol, and Elena D. Nikolskaya analyzed them using HPLC. Valentina G. Shuvatova, along with other authors, participated in writing the text of the article.

Funding. The work was carried out within the framework of the state assignment of the National Research Centre "Kurchatov Institute". The equipment used was from the Federal State Budgetary Institution "National Centre for Expertise and Medical Research" of the Ministry of Health of the Russian Federation, the resource center of the National Research Centre "Kurchatov Institute" and the N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Kuz'mina N. E., Aleshin S. V., Kuznetsov S. L., Tubasheva I. A., Shuvatova V. G., Sokol M. B., Nikolskaya E. D. Analysis of a polyfluorinated analogue of the nonsteroidal antiandrogen flutamide by nuclear magnetic resonance and liquid chromatography. *Drug development & registration*. 2026;15(1):146–160. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2217

ВВЕДЕНИЕ

При лечении рака предстательной железы существенную роль играют нестероидные антиандрогены [1–4]. Первый препарат этой группы флутамид (рисунок 1) был разрешен к широкому применению в 1989 году [1, 5, 6]. Во второй половине 1990-х годов были одобрены для лечения и другие нестероидные антиандрогены первого поколения – нилутамид (Анандрон®) и бикалутамид (Касодекс®) [1–3]. Они способны блокировать андрогенный импульс на уровне рецепторов предстательной железы [2]. Связываясь с андрогеновыми рецепторами цитозоля, антиандрогены конкурентно ингибируют захват и/или связывание андрогенов с тканями-мишенями, подавляют рост опухоли и вызывают регресс адрогензависимого рака простаты [5]. В настоящее время, кроме бикалутамида и флутамида, используются более эффективные ингибиторы андрогенных рецепторов второго поколения: энзалутамид, апалутамид и даролутамид [7, 8]. Все нестероидные антиандрогены были разработаны за рубежом.

В конце 1990-х и начале 2000-х годов в Российской Федерации проводились работы по синтезу полифторсодержащих структурных аналогов флутамида и изучению их цитотоксических свойств [9–11]. Среди полученных соединений высокий интерес представляло соединение 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил) нонанамид (CAS Registry Number 565176-69-4). У разработчиков данное вещество получило условное название «флустат» [11] и шифр F-4.

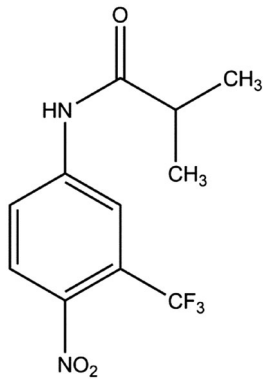


Рисунок 1. Структурная формула флутамида

Figure 1. Structural formula of flutamide

В исследованиях *in vitro* полифторкарбоксианилид F-4 показал более высокую, чем флутамид, цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток аденокарциномы простаты человека линии

LNCaP, определенную по методу Мосманна [10, 11]. При испытании *in vivo* на модели перевиваемой аденокарциномы предстательной железы крыс линии R3327-H Dunning у антиандрогена F-4 было выявлено более выраженное и продолжительное противоопухолевое действие по сравнению с флутамидом [10, 11].

В работе [10] описано получение соединения F-4 ацилированием 4-нитро-3-(трифторметил)анилина хлорангидридом перфторпеларгоновой кислоты. Данные инфракрасной спектроскопии, а также спектроскопии ядерного магнитного резонанса на протонах (^{1}H-ЯМР) подтвердили наличие в молекуле F-4 структурного фрагмента Ar—NHC(O)—. В ИК-спектре F-4 присутствовали характеристические полосы поглощения групп NH и C═O (3304 и 1716 см$^{-1}$). На ^{1}H-ЯМР-спектре обнаружены сигналы протонов ароматических CH-групп 8,24 (2H) и 8,33 (1H) м.д., а также протона NH-группы 11,85 (1H) м.д. Соединению F-4 была приписана структурная формула, представленная на рисунке 2.

Однако данные, приведенные в работе [10], не подтверждают положение и природу заместителей в ароматическом цикле, а также строение полифторированного алифатического фрагмента. Поэтому потребовалось более строгое доказательство строения соединения F-4 методами, которые позволяют идентифицировать не только наличие определенных структурных фрагментов в молекуле, но и последовательность их соединения друг с другом.

Продукты синтеза F-4 наряду с целевым соединением могут содержать родственные примеси, наличие и строение которых ранее не было изучено. Актуально было идентифицировать эти примеси и количественно оценить их содержание в образцах субстанции F-4.

Для решения поставленных задач были использованы методы спектроскопии ^{1}H-, ^{13}C-, ^{19}F-ЯМР, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым (ВЭЖХ-УФ) и тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Примеры применения спектроскопии ЯМР для идентификации основных компонентов в лекарственном препарате и их количественное определение без использования стандартных образцов представлены в работах [12, 13]. Использование ВЭЖХ с масс-селективным детектированием и ионизацией электроспреем для качественного анализа приведено в статье [14].

Цель исследования. Комплексный анализ строения соединения F-4 методами ЯМР и ВЭЖХ, а также идентификация и количественная оценка с их помощью содержания примесей в образцах субстанции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись лабораторные образцы субстанции соединения F-4 (I–IV), полученные известным методом [10, 11], а также исходные соединения (прекурсоры) – 4-нитро-3-(трифторметил) анилин и гептадекафторнонановая (перфторпеларгоновая) кислота разных производителей.

Реактивы

При получении образцов субстанции F-4 использовались: гептадекафторнонановая кислота, 97 % (35,445-9, Aldrich); перфторпеларгоновая кислота, 97 % (Пермский филиал НПО ГИПХ, СССР); 4-нитро-3-(трифторметил)анилин, 98 % (A6,880-7, Aldrich); 4-нитро-3-(трифторметил)анилин, 98 % (China National Chemical Construction Zhuhai Company, Китай).

Оборудование

Изучение веществ методами спектроскопии ЯМР проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США) с 5-миллиметровым мультиядерным датчиком, оснащенным градиентной катушкой и программным обеспечением (ПО) VNMRJ, версия 4.2 (Agilent Technologies, США).

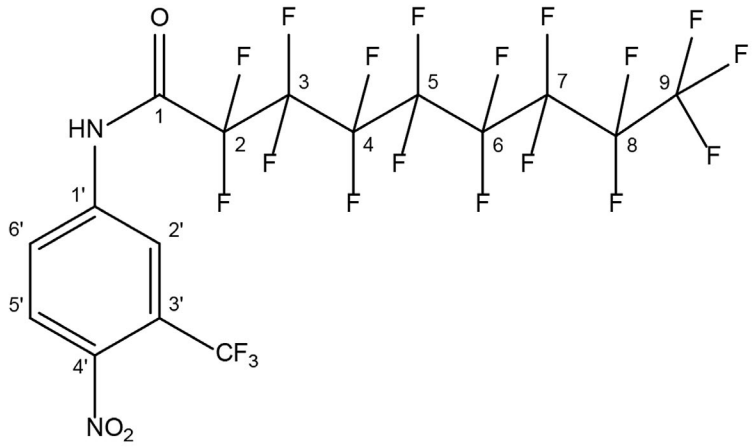


Рисунок 2. Структурная формула соединения F-4

Figure 2. Structural formula of compound F-4

Для хроматографических и масс-спектрометрических исследований образцов использовали жидкостные хроматографы:

- ✓ Agilent 1200, оснащенный диодно-матричным УФ-детектором G1315B, двухканальным насосом, автосамплером, термостатом колонок, ПО Agilent OpenLAB CDS ChemStation ver. C.01.08 (Agilent Technologies, США);
- ✓ Agilent Infinity II, оснащенный тандемным масс-селективным детектором с тройным квадруполем G6495C, двухканальным насосом, автосамплером, ПО Agilent MassHunter Workstation ver. 10.1 (Agilent Technologies, США).

Измерения методом ЯМР

Около 25 мг образца (точная навеска необязательна) помещали в ЯМР-ампулу, добавляли 0,5 мл дейтерированного диметилсульфоксида (ДМСО-d6, D 99,9 %, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США), интенсивно встряхивали до полного растворения образца. Регистрацию спектров ЯМР проводили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600. Параметры 1D-экспериментов: температура – 27 °C; ширина спектра – 9615,4 Гц (^{1}H) и 32051,8 Гц (^{13}C), 31578,9 Гц (^{19}F); угол поворота намагниченности – 45°; время релаксации – 5 с (^{1}H), 2 с (^{13}C), 5 с (^{19}F); количество накоплений спада свободной индукции – 256 (^{1}H) и 16 000 (^{13}C), 256 (^{19}F); число точек аналого-цифрового преобразования – 64 K; экспоненциальное умножение – 0,3 Гц (^{1}H) и 1,5 Гц (^{13}C), 1,5 Гц (^{19}F); дополнение нулями – 64 K; автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы, калибровка шкалы химических сдвигов (δ) под сигналы ДМСО (δ = 2,50 м.д. для ^{1}H и 39,52 для ^{13}C) и $CFCl_3$ (δ = 0,00 м.д. для ^{19}F) [15]). Регистрацию двумерных спектров (2D) ^{1}H-^{1}H-gCOSY, ^{19}F-^{19}F-gCOSY, ^{1}H-^{13}C-gHSQC, ^{19}F-^{13}C-gHSQC, ^{1}H-^{13}C-gHMBC проводили с применением стандартных параметров.

Получены следующие данные из ^{1}H-, ^{13}C- и ^{19}F-спектров ЯМР (ДМСО-d6).

Соединение F-4. ^{1}H, δ, м.д.: 11,87 (с, 1H, NH), 8,32 (уш. с, 1H, CH), 8,22 (уш. д, J 9,0 Гц, 1H, CH), 8,20 (уш. д, J 9,0 Гц, 1H, CH).

^{13}C, δ, м.д.: 155,87 (т, J 27,2 Гц, C═O), 143,41 с, 140,71 с, 127,27 с, 124,83 с, 122,66 (кв, J 33,3 Гц, CF_3—C), 121,67 (кв, J 272,9 Гц, CF_3), 119,52 (кв, J 5,6 Гц), 116,46 (квт, J 287,6 и 33,3 Гц, CF_3—CF_2), 108,31 (тт, J 270,0 и 31,3 Гц, CF_2—C═O), 110,51 (м, 6CF_2).

^{19}F, δ, м.д.: –126,50 (м, 2F, CF_2), –123,09 (м, 2F, CF_2), –122,45 (м, 2F, CF_2), –122,25 (м, 2F, CF_2), –122,13 (м, 2F, CF_2), –121,75 (м, 2F, CF_2), –118,67 (т, J 12,2 Гц, 2F, CF_2—C═O), –81,24 (т, J 10,1 Гц, 3F, CF_3—CF_2), –59,75 (с, 3F, CF_3—C).

4-нитро-3-(трифторметил)анилин. ^{1}H, δ, м.д.: 8,00 (д, J 9,1 Гц, 1H, CH), 7,05 (д, J 2,5 Гц, 1H, CH), 6,97 (уш. с, 2H, NH_2), 6,80 (дд, J 9,1 и 2,5 Гц, 1H, CH). ^{19}F, δ, м.д.: –59,79 (с, 3F, CF_3).

Перфторпеларгоновая кислота. ^{19}F, δ, м.д.: –126,43 (м, 2F, CF_2), –123,04 (м, 2F, CF_2), –122,89 (м, 2F, CF_2), –122,23 (м, 2F, CF_2), –122,17 (м, 2F, CF_2), –121,91 (м, 2F, CF_2), –118,30 (т, J 12,2 Гц, 2F, CF_2—C═O), –81,14 (т, J 10,1 Гц, 3F, CF_3—CF_2).

Относительное содержание примеси в образцах субстанции F-4 определяли как массовую долю вещества *i* ($X_{i,\text{масс}}$) в смеси *n* известных компонентов методом внутренней нормализации[1] по формуле:

$$X_{i,\text{масс}}(\%) = \frac{M_i \cdot S_i'}{\sum_{j=1}^{j=n} M_j \cdot S_j'} \cdot 100,$$

где M_i – молекулярная масса анализируемого компонента *i*; S_i' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала компонента *i*; M_j – молекулярная масса и S_j' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала каждого компонента *j* (j = 1, 2, … n), n – число компонентов испытуемого образца [12].

Для каждого из образцов за результат принимали усредненное значение трех измерений с указанием двухстороннего доверительного интервала для вероятности 0,95. Двухсторонний доверительный интервал и значения RSD (относительное стандартное отклонение, relative standard deviation) рассчитывали по ГОСТ Р 50779.22-2005[2] с помощью программы Microsoft Office Excel 2007 с установленным пакетом «Анализ данных» (США).

Метод ВЭЖХ-УФ

Хроматографическое разделение субстанции F-4 проводили на аналитической колонке Luna C18(2), 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США). Для приготовления подвижной фазы использовали: деионизированную воду аналитического качества (Milli-Q), полученную на установке Millipore Integral A10 (Франция); ацетонитрил, класс «for LC-MS» (Panreac Quimica S.L.U., Испания) и кислоту муравьиную для ЖХ-МС LiChropur™, 97,5–98,5 % (Sigma-Aldrich, США). В качестве компонентов подвижной фазы использовали: 0,1 % (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (компонент 1) и 0,1 % (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (компонент 2). Применялся режим градиентного элюирования: 0–60 мин – 10 % компонента 2, 60–90 мин – увеличение содержания

[1] ОФС.1.2.1.1.0007 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса». Государственная фармакопея РФ. XV издание. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-1-metody-spektralnogo-analiza/spektroskopiya-yadernogo-magnitnogo-rezonansa/ Ссылка активна на 06.10.2025.

[2] ГОСТ Р 50779.22-2005. Статистические методы. Статистическое представление данных. Точечная оценка и доверительный интервал для среднего. Доступно по: https://internet-law.ru/gosts/gost/4946/?ysclid=m9yjh1kkex446036205. Ссылка активна на 06.10.2025.

компонента 2 до 90 %, 90–100 мин – 90 % компонента 2. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура колонки – 30 °C, объем вводимой пробы – 30 мкл. Детектирование осуществлялось при аналитической длине волны 250 нм. Продолжительность анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляла 120 мин.

Метод ВЭЖХ-МС/МС

Хроматографические условия были аналогичны ВЭЖХ-УФ (колонка, подвижная фаза, режим элюирования и прочее – см. выше), объем вводимой пробы составил 3 мкл. Детектирование осуществлялось при отрицательном режиме ионизации в электроспрее (–ESI, electrospray ionization). Условия ионизации: напряжение на капилляре – 3,0 кВ, температура капилляра – 350 °C, скорость потока осушающего газа (азот) – 14 л/мин, температура газа – 250 °C, напряжение на фрагменторе – 160 В, давление небулайзера – 1,7 бар. Диапазон сканирования – от *m/z* 20 до 1000, точность определения масс на приборе – 1 Да.

Приготовление рабочих растворов: навески 25 мг субстанции F-4 (образцов I–IV), а также исходного 4-нитро-3-(трифторметил)анилина помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл и растворяли в ацетонитриле. Концентрация каждого полученного раствора составила 1 мг/мл. Для приготовления раствора модельной смеси в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 0,25 мл раствора 1 мг/мл 4-нитро-3-(трифторметил)анилина, затем доводили до метки рабочим раствором образца III и перемешивали. Получали раствор модельной смеси в ацетонитриле с концентрациями ~10 мкг/мл 4-нитро-3-(трифторметил)анилина и ~990 мкг/мл образца III.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обзорные спектры ^{1}H-, ^{13}C- и ^{19}F-ЯМР субстанции F-4 приведены на рисунке 3.

В таблице 1 представлена структурная интерпретация спектров ^{1}H-, ^{13}C- и ^{19}F-ЯМР соединения F-4, проведенная с учетом полученных значений химических сдвигов сигналов (δ), их мультиплетности и данных гомоядерных и гетероядерных 2D-экспериментов ^{1}H-^{1}H-gCOSY, ^{19}F-^{19}F-gCOSY, ^{1}H-^{13}C-gHSQC, ^{19}F-^{13}C-gHSQC, ^{1}H-^{13}C-gHMBC. Нумерация атомов в таблице 1 соответствует нумерации атомов на рисунке 2.

Проведенная структурная интерпретация спектров ЯМР однозначно свидетельствует о том, что соединение F-4 имеет структуру 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)нонанамида, представленную на рисунке 2.

В спектрах ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР образцов субстанций F-4 были обнаружены сигналы продуктов синтеза – примесных соединений (примесей) A и B (рисунок 4), которые не относятся к исходным компонентам – перфторпеларгоновой кислоте и 4-нитро-3-(трифторметил)анилину.

Таблица 1. Спектральные характеристики ^{1}H-, ^{13}C-, ^{19}F-ЯМР соединения F-4

Table 1. ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F NMR spectral characteristics of compound F-4

№ атома No. of atom	Химический сдвиг, δ, м.д. (J, Гц)* Chemical Shift, δ, ppm (J, Hz)*		
	^{1}H	^{13}C	^{19}F
1		155,87 т (27,2) 155.87 t (27.2)	
2		108,31 тт (270,0; 31,3) 108.31 tt (270.0; 31.3)	–118,67 т (12,2) –118.67 t (12.2)
3		110,5 м 110.5 m	–121,75 м –121.75 m
4		110,5 м 110.5 m	–122,25 м –122.25 m
5		110,5 м 110.5 m	–126,50 м –126.50 m
6		110,5 м 110.5 m	–122,45 м –122.45 m
7		110,5 м 110.5 m	–122,13 м –122.13 m
8		110,5 м 110.5 m	–123,09 м –123.09 m
9		116,46 квт (287,6; 33,3) 116.46 qvt (287.6; 33.3)	–81,24 т (10,1) –81.24 t (10.1)
NH	11,87 с 11.87 s		
1′		143,41 с 143.41 s	
2′	8,32 уш. с 8.32 br. s	119,52 кв (5,6) 119.52 qv (5.6)	
3′		122,66 кв (33,3) 122.66 qv (33.3)	
4′		140,71 с 140.71 s	
5′	8,20 уш. д (9,0) 8.20 br. d (9.0)	127,27 с 127.27 s	
6′	8,22 уш. д (9,0) 8.22 br. d (9.0)	124,83 с 124.83 s	
3′-CF_3		121,67 кв (272,9) 121.67 qv (272.9)	–59,75 с –59.75 s

Примечание. * Сокращения: м.д. – миллионная доля; J – константа спин-спинового взаимодействия (Гц); с – синглет; уш. с – уширенный синглет; уш. д – уширенный дублет; д – дублет; дд – дублет дублетов; т – триплет; тт – триплет триплетов; м – мультиплет; кв – квартет; квт – квартет триплетов.

Note. * Abbreviations: ppm – parts per million; J – spin-spin interaction constant (Hz); s – singlet; br. s – broadened singlet; br. d – broadened doublet; d – doublet; dd – doublet of doublets; t – triplet; tt – triplet of triplets; m – multiplet; qv – quartet; qvt – quartet of triplets.

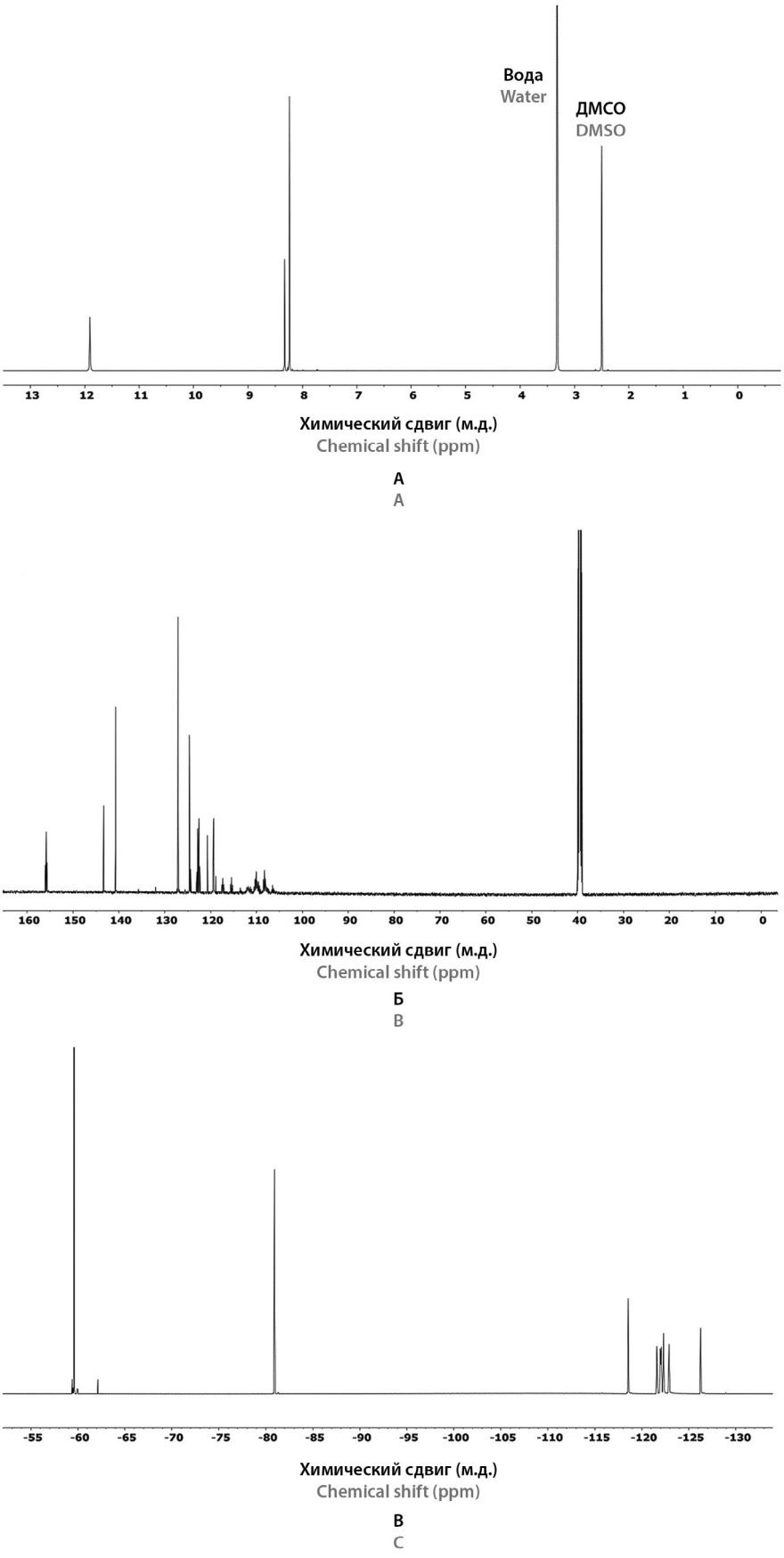


Рисунок 3. **Спектры ЯМР ^{1}H (А), ^{13}C (Б) и ^{19}F (В) субстанции F-4**

Figure 3. **NMR spectra ^{1}H (A), ^{13}C (B) and ^{19}F (C) of substance F-4**

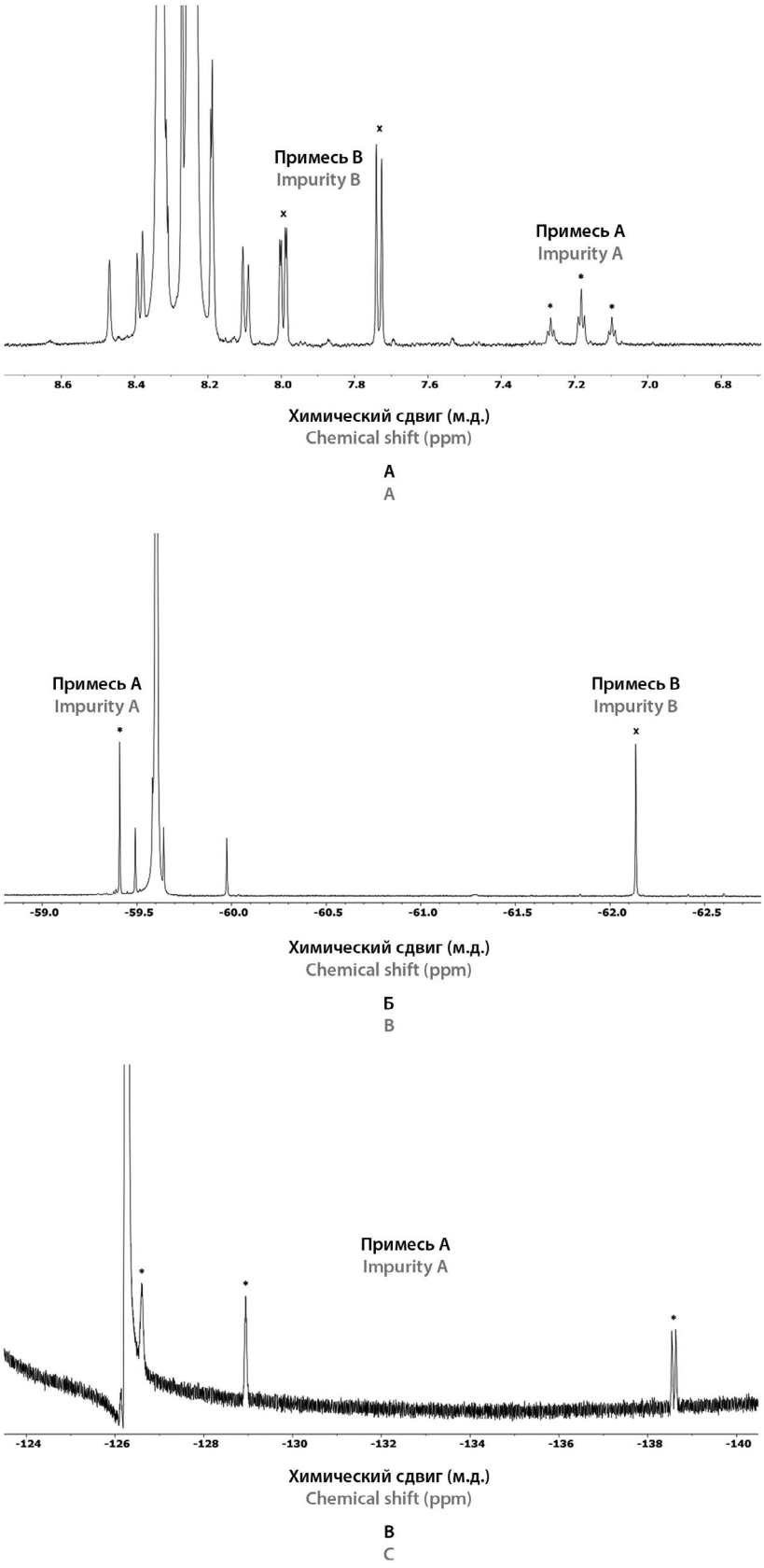


Рисунок 4. **Фрагменты спектров ЯМР ^{1}H (А) и ^{19}F (Б, В) субстанции F-4 (образец III), содержащие сигналы примесей A (*) и B (×)**

Figure 4. **Fragments of the ^{1}H (A) and ^{19}F (B, C) NMR spectra of substance F-4 (sample III) containing signals of impurities A (*) and B (×)**

Примесь А. ^{1}H, δ, м.д.: 7,16 (тт, J 50,4, 5,3 Гц; CHF_2). ^{19}F, δ, м.д.: –138,77 (д, J 50,4 Гц; 2F, CHF_2); –129,01 (уш. с, 2F, CF_2); –126,91 (уш. д, J 52,45 Гц; 2F, CF_2); –59,46 (с, 3F, CF_3).

Примесь В. ^{1}H, δ, м.д.: 11,55 (с, NH); 7,97 (дд, J 8,9, 2,0 Гц; $^{1}H_{Ar}$); 7,69 (д, J 8,9 Гц; $^{1}H_{Ar}$). ^{19}F, δ, м.д.: –62,30 (с, 3F, CF_3).

Анализ субстанции F-4 методом ВЭЖХ-УФ показал наличие на хроматограммах всех образцов (I–IV) пиков основного вещества (время удерживания, в. у. 93–96 мин) и примеси А (в. у. 91–93 мин) (рисунок 5). На хроматограммах образцов III и IV дополнительно был обнаружен пик примеси В (в. у. 96–98 мин).

На хроматограмме раствора модельной смеси (рисунок 6), кроме пиков основного вещества F-4, примесей А и В, присутствует пик исходного 4-нитро-3-(трифторметил)анилина (в. у. 79–80 мин), добавленного в качестве свидетеля на стадии приготовления. Пики компонентов модельной смеси в разработанных условиях были полностью разделены, эффективность разделения составила не менее $80 \cdot 10^3$ теоретических тарелок, разрешение между пиками – не менее 11.

Раствор модельной смеси проявил стабильность в процессе хранения при комнатной температуре в течение 1 месяца. Повторный его анализ показал отсутствие значимых изменений площадей пиков друг относительно друга и других хроматографических характеристик.

ВЭЖХ-УФ-анализ всех образцов I–IV субстанции F-4 не выявил наличие в них исходного 4-нитро-3-(трифторметил)анилина, что подтверждалось и данными ЯМР.

При анализе модельного раствора методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью ионизации электроспреем в отрицательном режиме (–ESI) для всех хроматографических пиков на масс-спектрах были получены максимально интенсивные сигналы (основные пики) величин отношения массы к заряду (*m/z* max), которые обычно соответствуют депротонированным, отрицательно заряженным молекулярным ионам $[M–nH]^-$, где $n = 1, 2$ (рисунок 7). В кластере с основным пиком также присутствуют менее интенсивные сигналы с массовыми числами на 1–2 больше, чем *m/z* max.

Для хроматографического пика целевого соединения F-4 (в. у. ~93,9 мин) на масс-спектре (рисунок 7, В) были зарегистрированы основной сигнал с *m/z* max 650,8 и менее интенсивные пики с *m/z* 651,8 (20,4 %) и 652,8 (2,2 %). В скобках приведены их относительные интенсивности ($I_{отн.}$) в процентах от интенсивности основного пика, принимаемой за 100 %. Согласно данным спектроскопии ЯМР соединению F-4 (таблица 1) соответствует структурная формула, изображенная на рисунке 2. Его молекулярная формула (molecular formula) – $C_{16}H_4F_{20}N_2O_3$ и относительная молекулярная масса M_r (molecular weight) – 652,19 (таблица 2).

На рисунках 7, А, Б, Г представлены масс-спектры других компонентов модельной смеси: исходного 4-нитро-3-(трифторметил)анилина, примесей А и В. У основных пиков этих соединений *m/z* max 204,9,

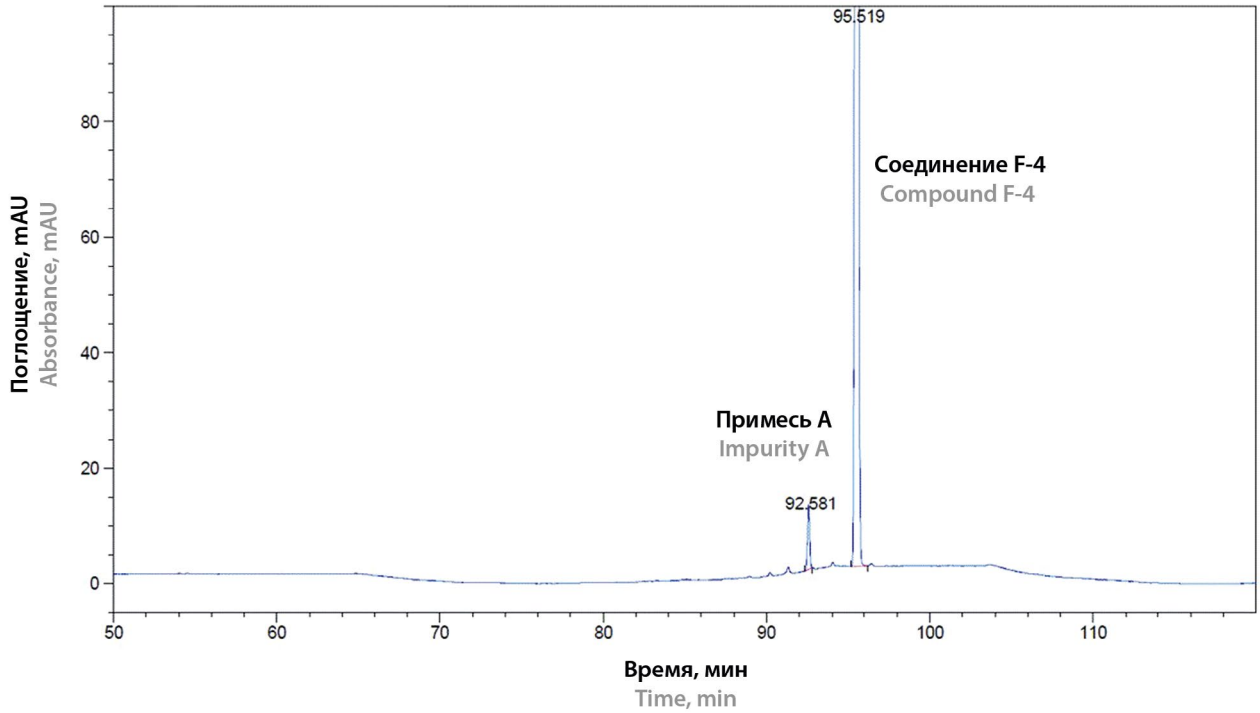


Рисунок 5. Хроматограмма субстанции F-4 (образец II)

Figure 5. Chromatogram of substance F-4 (sample II)

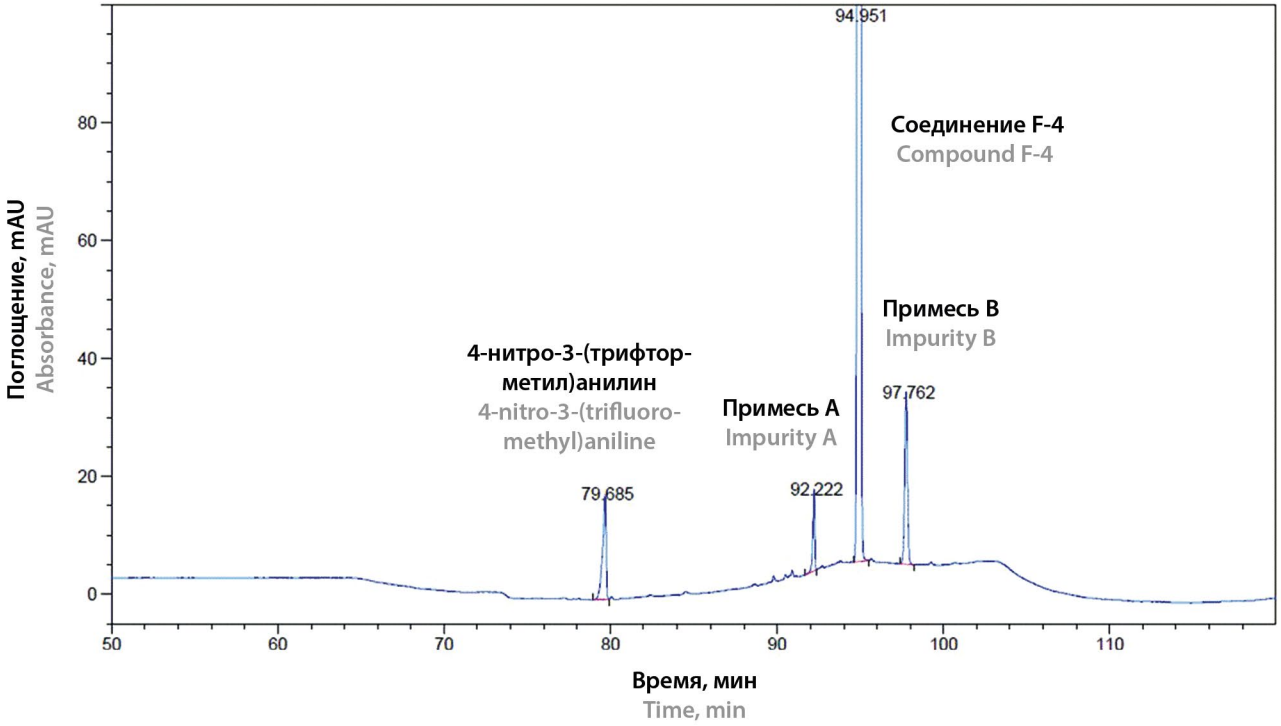


Рисунок 6. **Хроматограмма модельной смеси**

Figure 6. **Chromatogram of a model solution**

633,0 и 639,7 соответственно. В таблице 2 суммированы полученные данные: название компонента, время удерживания, величины *m/z* max основного пика, *m/z* пиков других ионов и $I_{отн.}$.

По данным таблицы 2, в масс-спектре примеси B имеются два пика с *m/z* max 639,7 (100 %) и *m/z* 641,7 (33,7 %), у которых разница массовых чисел Δ*m/z* равна 2. Соотношение относительных интенсивностей пиков составляет 100 : 33,7 ≈ 3,0 : 1. Это свидетельствует о наличии в анализируемом веществе одного атома хлора и обусловлено соотношением ~3,09 : 1 природной распространенности изотопов $^{35}Cl : {}^{37}Cl$ [16].

Комплексный анализ результатов исследования образцов субстанции F-4 методами ^{1}H-, ^{19}F-ЯМР и ВЭЖХ показал, что двум обнаруженным родственным примесям[1] A и B соответствуют структуры, представляющие собой 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-гексадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)нонанамид (примесь A) и *N*-(3-(трифторметил)-4-хлорфенил)-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафторнонанамид (примесь B), изображенные на рисунке 8.

[1] ОФС.1.1.0023 «Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах». Государственная фармакопея РФ. XV издание. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/rodstvennye-primesi-v-farmatsevticheskikh-substantsiyakh-i-lekarstvennykh-preparatakh/?sphrase_id=997619. Ссылка активна на 06.10.2025.

Можно предположить, что источником примесей A и B в образцах субстанции F-4 являются технологические примеси, присутствующие в исходных соединениях. Действительно, в спектрах ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР образца исходной перфторпеларгоновой кислоты были обнаружены сигналы примесного соединения – 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-гексадекафторпеларгоновой кислоты $CHF_2(CF_2)_7COOH$ {^{1}H, δ, м.д.: 7,17 (тт, J 50,4, 5,2 Гц; CHF_2). ^{19}F, δ, м.д.: –138,64 (д, J 50,4 Гц; 2F, CHF_2), –129,01 (уш. с, 2F, CF_2), –126,91 (уш. д, J 52,45 Гц; 2F, CF_2)}. Данная примесь превращается при синтезе субстанции F-4 в примесь A. Образование примеси B в субстанции F-4, наиболее вероятно, обусловлено присутствием 3-(трифторметил)-4-хлоранилина в исходном образце 4-нитро-3-(трифторметил)анилина.

В таблице 3 представлены результаты измерения количественного содержания примесей A и B в различных образцах субстанции F-4 методами спектроскопии ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР. Каждый образец рассматривали как смесь 3 компонентов: собственно соединение F-4, примесь A и примесь B. При расчете относительного содержания примесей по спектрам ^{1}H-ЯМР измеряли интегральные интенсивности сигналов протонов концевой группы CHF_2 в алифатическом фрагменте молекулы (примесь A) и ароматических протонов в положениях 5′ и 6′ (примесь B) относительно интегральной интенсивности сигналов вицинальных протонов соединения F-4 (5′-H_{Ar} и 6′-H_{Ar}, см. таблицу 1). Боковые сигналы не включали в область интегрирования, *S′* = 200 (см. рисунок 4, A).

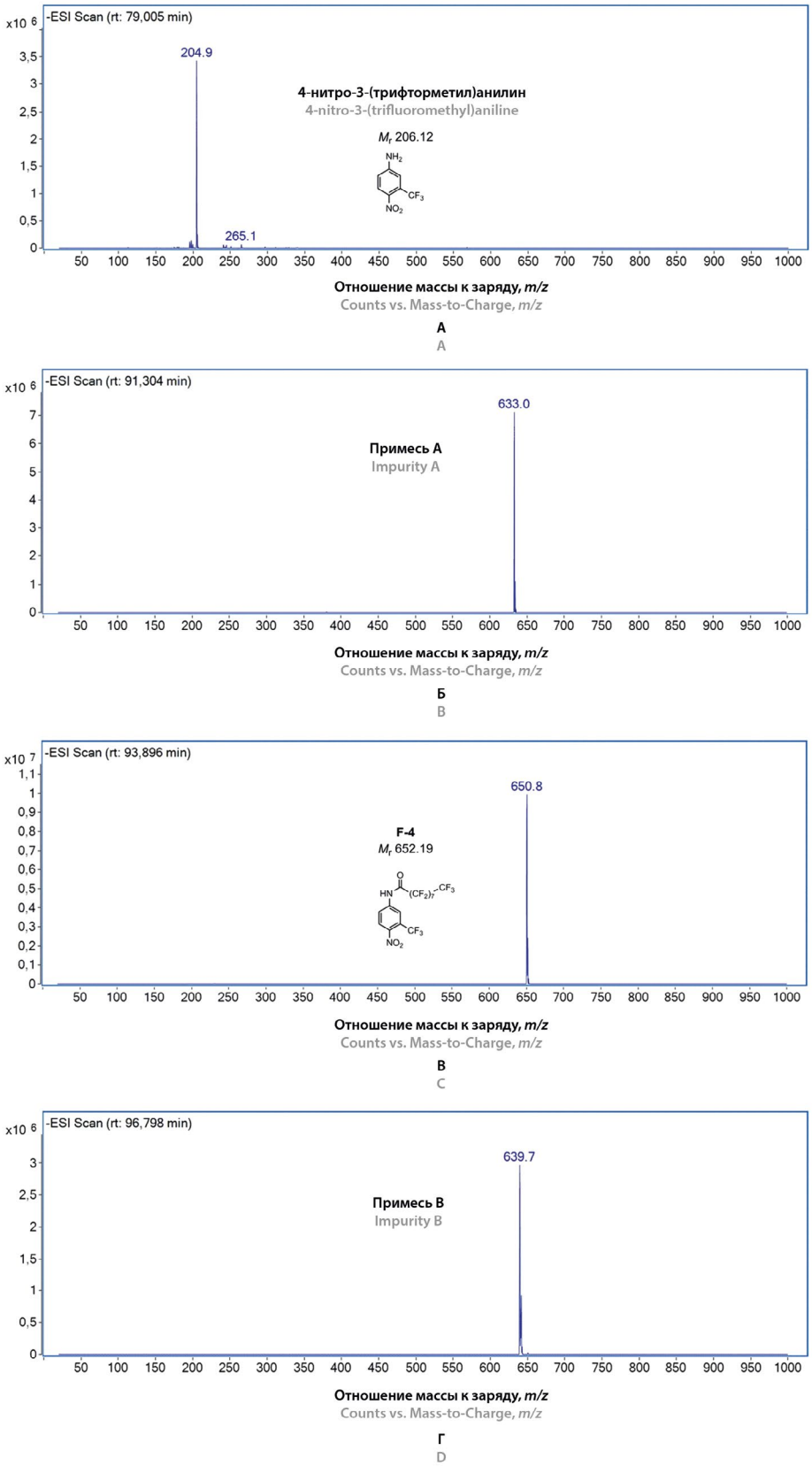


Рисунок 7. **Масс-спектры компонентов модельной смеси:**
А – 4-нитро-3-(трифторметил)анилина; Б – примеси А; В – соединения F-4; Г – примеси В

Figure 7. **Mass spectra of the components of the model mixture:**
A – 4-nitro-3-(trifluoromethyl)aniline; B – impurity A; C – compound F-4; D – impurity B

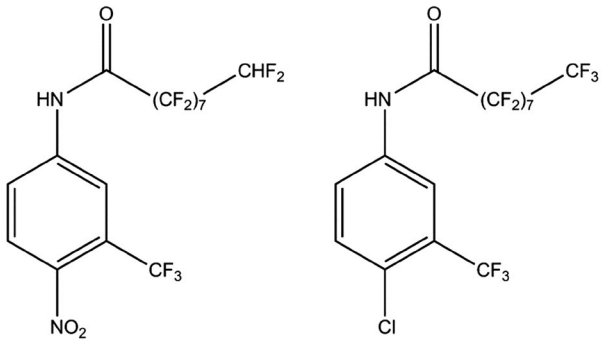
Таблица 2. Основные хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов модельной смеси по данным ВЭЖХ-МС/МС

Table 2. Main chromatographic and mass spectrometric characteristics of the components of the model mixture according to HPLC-MS/MS data

Название компонента Component name	**Время удерживания, мин** Retention time, min	***m/z* max***	***m/z* ($I_{отн.}$, %)** *m/z* ($I_{rel.}$, %)****	**Молекулярная формула** Molecular formula	**Относительная молекулярная масса** Molecular weight
4-нитро-3-(трифторметил) анилин 4-nitro-3-(trifluoromethyl) aniline	79,0	204,9	195,8 (3,2) 197,8 (3,8) 199,7 (2,1) 206,0 (6,8)	$C_7H_5F_3N_2O_2$	206,12
Примесь А Impurity A	91,3	633,0	634,0 (14,8) 635,0 (1,6)	$C_{16}H_5F_{19}N_2O_3$	634,20
Соединение F-4 Compound F-4	93,9	650,8	651,8 (20,4) 652,8 (2,2)	$C_{16}H_4F_{20}N_2O_3$	652,19
Примесь В Impurity B	96,8	639,7	640,7 (22,3) 641,7 (33,7) 642,7 (4,9)	$C_{16}H_4ClF_{20}NO$	641,63

Примечание. * Отношение массы к заряду основного пика.
** Величина *m/z* других ионов, в скобках – относительная интенсивность сигнала $I_{отн.}$ (%).

Note. * Mass-to-charge ratio of the main peak.
** The *m/z* value of other ions, in brackets is the relative signal intensity $I_{rel.}$ (%).



Примесь А Impurity A

Примесь В Impurity B

Рисунок 8. Структурные формулы примесей, обнаруженных в образцах субстанции F-4

Figure 8. Structural formulas of impurities detected in samples of substance F-4

По спектрам ^{19}F-ЯМР относительное содержание примесей А и В определяли, измеряя интегральные интенсивности сигналов ароматических групп 3′-CF_3 каждой примеси относительно аналогичного сигнала соединения F-4 , *S*' = 100 (см. рисунок 4, Б). Относительные молекулярные массы всех компонентов приведены в таблице 2.

Из таблицы 3 следует, что массовые доли примесей А и В в образцах I–IV субстанции F-4, определенные двумя методами (^{1}H- и ^{19}F-ЯМР), практически совпадают, различия между полученными средними значениями статистически незначимы. Относительное содержание каждой примеси находится в диапазоне от 1,0 до 1,62 % масс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного комплексного исследования методами спектроскопии ЯМР (^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{1}H-^{1}H-gCOSY, ^{19}F-^{19}F-gCOSY, ^{1}H-^{13}C-gHSQC, ^{19}F-^{13}C-gHSQC, ^{1}H-^{13}C-gHMBC), а также ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-УФ было установлено следующее:

1. Соединение F-4 соответствует структуре 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)нонанамида.
2. В образцах субстанции F-4 обнаружены две основные родственные примеси, структуры которых представляли 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-гексадекафтор-*N*-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)нонанамид (примесь А) и *N*-(3-(трифторметил)-4-хлорфенил)-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-гептадекафторнонанамид (примесь В).
3. Определены спектральные характеристики, позволяющие методами ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР идентифицировать и количественно оценивать содержание примесей А и В в субстанции F-4. Результаты определения содержания этих примесей с помощью спектроскопии ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР практически совпадают, различия между полученными средними значениями статистически незначимы. Относительное содержание каждой примеси не превышало 1,7 %.

Таблица 3. Содержание примесей A и B в образцах субстанции F-4, определенное методами ^{1}H- и ^{19}F-ЯМР

Table 3. The content of impurities A and B in samples of substance F-4, determined by ^{1}H and ^{19}F NMR methods

Образец Sample	Примесь Impurity	Ядро Core	№ эксперимента Experiment No.	*S'**	Массовая доля, масс. % Mass fraction, mass %	Средняя массовая доля, масс. % Average mass fraction, mass %
I	A	^{1}H	1	1,48	1,418	1,40 ± 0,05 (RSD 1,36 %)
			2	1,46	1,399	
			3	1,44	1,380	
		^{19}F	1	1,42	1,361	1,37 ± 0,03 (RSD 0,80 %)
			2	1,44	1,380	
			3	1,44	1,380	
	B	^{1}H, ^{19}F	Примесь B отсутствует Impurity B is absent			
II	A	^{1}H	1	1,35	1,295	1,29 ± 0,04 (RSD 1,14 %)
			2	1,33	1,276	
			3	1,36	1,305	
		^{19}F	1	1,35	1,295	1,29 ± 0,01 (RSD 0,40 %)
			2	1,34	1,286	
			3	1,35	1,296	
	B	^{1}H, ^{19}F	Примесь B отсутствует Impurity B is absent			
III	A	^{1}H	1	1,17	1,107	1,09 ± 0,05 (RSD 2,03 %)
			2	1,14	1,108	
			3	1,13	1,069	
		^{19}F	1	1,15	1,088	1,08 ± 0,04 (RSD 1,51 %)
			2	1,16	1,098	
			3	1,12	1,060	
	B	^{1}H	1	1,60 1,57	1,516	1,51 ± 0,03 (RSD 0,73 %)
			2	1,58 1,55	1,497	
			3	1,61 1,56	1,516	
		^{19}F	1	1,56	1,493	1,51 ± 0,07 (RSD 1,99 %)
			2	1,57	1,502	
			3	1,62	1,549	
IV	A	^{1}H	1	1,07	1,013	1,00 ± 0,02 (RSD 0,95 %)
			2	1,05	0,994	
			3	1,06	1,004	
		^{19}F	1	1,07	1,013	1,02 ± 0,03 (RSD 1,11 %)
			2	1,09	1,032	
			3	1,07	1,013	
	B	^{1}H	1	1,68 1,67	1,602	1,60 ± 0,03 (RSD 0,79 %)
			2	1,69 1,67	1,607	
			3	1,69 1,62	1,586	
		^{19}F	1	1,67	1,597	1,62 ± 0,08 (RSD 2,04 %)
			2	1,67	1,597	
			3	1,73	1,657	

Примечание. * *S'* – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала примеси A или B.

Note. * *S'* – normalized value of the integral intensity of the impurity signal A or B.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишугин С. В., Грицкевич А. А., Русаков И. Г. Эволюция изучения и клинического применения антиандрогенов в лечении распространенного рака предстательной железы. *Медицинский Совет*. 2016;(10):34–37. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-10-34-37.
2. Бухаркин Б. В., Гриднева Я. В., Митин А. А. Нестероидные антиандрогены в лечении рака предстательной железы. *Русский медицинский журнал*. 2009;17(22):1497–1499.
3. Бухаркин Б. В., Аксенов А. А. Применение антиандрогенов в монорежиме при лечении рака предстательной железы. *Онкоурология*. 2005;(5):43–47.
4. Носов Д. А., Волкова М. И., Гладков О. А., Карабина Е. В., Крылов В. В., Матвеев В. Б., Усычкин С. В., Митин Т. Рак предстательной железы. *Злокачественные опухоли*. 2024;14(3s2-2):242–266. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-10.
5. Зиганшина Л. Е., Лепахин В. К., Петров В. И., Хабриев Р. У., ред. Большой справочник лекарственных средств. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 3344 с.
6. Sternal R., Nugara N. Flutamide. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Vol. 27. In: Brittain H. G., editor. Analytical profiles of drug substances. Volume 27. San Diego: Academic Press; 2001. P. 115–157.
7. Ушкалова Е. А., Зырянов С. К., Гопиенко И. А. Ингибиторы андрогенных рецепторов второго поколения в терапии неметастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы: роль профиля безопасности и влияния на качество жизни. *Вопросы онкологии*. 2021;67(2):217–226. DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-2-217-226.
8. Kandil S. B., McGuigan C., Westwell A. D. Synthesis and Biological Evaluation of Bicalutamide Analogues for the Potential Treatment of Prostate Cancer. *Molecules*. 2020;26(1):56. DOI: 10.3390/molecules26010056.
9. Крюкова Л. Ю., Москалева Е. Ю., Астахов Д. В., Посыпанова Г. А., Родина А. В., Поташников П. Ф., Воронцов Е. А., Кузнецов С. Л., Крюков Л. Н., Северин С. Е. Синтез полифторсодержащих аналогов флутамида и их цитотоксическая активность. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 1998;(3):29–32.
10. Катлинский А. В., Северин Е. С., Северин С. Е., Крюков Л. Н., Москалева Е. Ю., Воронцов Е. А., Смирнова З. С., Крюкова Л. Ю., Белушкина Н. Н., Кузнецов С. Л., Фельдман Н. Б., Пальцев М. А. Аналоги флутамида: синтез, биоактивность и перспективы медицинского применения. *Молекулярная медицина*. 2003;(2):60–64.
11. Аляутдин Р. Н., Воронцов Е. А., Иванов А. А., Крюков Л. Н., Кузнецов С. Л., Москалева Е. Ю., Пальцев М. А., Посыпанова Г. А., Северин Е. С., Северин С. Е., Хомяков Ю. Н. 4-Нитро-3-трифторметил-перфторнонаноиланилид (флустат), способ его получения и фармацевтическая композиция на его основе. Патент РФ на изобретение № 2186057 С1 от 27.07.2002. Доступно по: https://patents.google.com/patent/RU2186057C1/ru?oq=RU2186057C1. Ссылка активна на 07.02.2025.
12. Моисеев С. В., Крылов В. И., Мастеркова Т. В., Яшкир В. А., Бунятян Н. Д. Использование метода ЯМР-спектроскопии для подтверждения подлинности, идентификации и количественного определения посторонних примесей субстанции салициловой кислоты. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2014;(1):15–19.
13. Кузьмина Н. Е., Моисеев С. В., Якупов И. Ю., Кулешова С. И. Количественное определение основных компонентов в лекарственных препаратах полимиксина В методом ЯМР-спектроскопии. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(2):206–212. DOI: 10.30895/1991-2919-2025-15-2-206-212.
14. Сапон Е. С., Лугин В. Г., Совастей О. Г., Ефремова А. А., Гарипов Р. М. Применение ВЭЖХ-МС с электроспрей ионизацией для качественного анализа антибиотиков цефалоспоринового ряда. *Вестник казанского технологического университета*. 2014;17(17):136–138.
15. Gottlieb H. E., Kotlyar V., Nudelman A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*. 1997;62(21):7512–7515. DOI: 10.1021/jo971176v.
16. Зенкевич И. Г., Иоффе Б. В. Интерпретация масс-спектров органических соединений. Л.: Химия; 1986. С. 61–65.

REFERENCES

1. Mishugin S. V., Gritskevich A. A., Rusakov I. G. Development and clinical effectiveness of antiandrogens in the treatment of advanced prostate cancer. *Medical Council*. 2016;(10):34–37. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2016-10-34-37.
2. Bukharkin B. V., Gridneva Ya. V., Mitin A. A. Nonsteroidal antiandrogens in the treatment of prostate cancer. *Russian Medical Journal*. 2009;17(22):1497–1499. (In Russ.)
3. Bukharkin B. V., Aksenov A. A. Use of antiandrogens in monotherapy in the treatment of prostate cancer. *Canser Urology*. 2005;(3):43–47. (In Russ.)
4. Nosov D. A., Volkova M. I., Gladkov O. A., Karabina E. V., Krylov V. V., Matveev V. B., Usychkin S. V., Mitin T. Prostate cancer. *Malignant tumors*. 2024;14(3s2-2):242–266. (In Russ.) DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-10.
5. Ziganshina L. E., Lepakhin V. K., Petrov V. I., Khabriev R. U., editors. Large reference book of medicine. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. 3344 p. (In Russ.)
6. Sternal R., Nugara N. Flutamide. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Vol. 27. In: Brittain H. G., editor. Analytical profiles of drug substances. Volume 27. San Diego: Academic Press; 2001. P. 115–157.
7. Ushkalova E. A., Zyryanov S. K., Gopienko I. A. Second-generation androgen receptor inhibitors in therapy of non-metastatic castration resistant prostate cancer: role of safety profile and effect on quality of life. *Problems in Oncology*. 2021;67(2):217–226. (In Russ.) DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-2-217-226.
8. Kandil S. B., McGuigan C., Westwell A. D. Synthesis and Biological Evaluation of Bicalutamide Analogues for the Potential Treatment of Prostate Cancer. *Molecules*. 2020;26(1):56. DOI: 10.3390/molecules26010056.
9. Kryukova L. Yu., Moskaleva E. Yu., Astakhov D. V., Posypanova G. A., Rodina A. V., Potashnikov P. F., Vorontsov E. A., Kuznetsov S. L., Kryukov L. N., Severin S. E. Synthesis of polyfluorinated analogues of flutamide and their cyto-

toxic activity. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical chemistry.* 1998;(3):29–32. (In Russ.)

10. Katlinskiy A. V., Severin E. S., Severin S. E., Kryukov L. N., Moskaleva E. Yu., Vorontsov E. A., Smirnova Z. S., Kryukova L. Yu., Belushkina N. N., Kuznetsov S. L., Feldman N. B., Paltsev M. A. Analogues of flutamide: synthesis, biological activity and prospects of medical application. *Molecular medicine*. 2003;(2):60–64. (In Russ.)
11. Alyautdin R. N., Vorontsov E. A., Ivanov A. A., Kryukov L. N., Kuznetsov S. L., Moskaleva E. Yu., Paltsev M. A., Posypanova G. A., Severin E. S., Severin S. E., Khomyakov Yu. N. 4-Nitro-3-fluoromethylperfluorononanoylanilide (flustat), method if its synthesis and pharmaceutical composition based on thereof. Patent RUS No. 2186057 C1 dated 27.07.2002. Available at: https://patents.google.com/patent/RU2186057C1/en?oq=RU2186057C1. Accessed: 07.02.2024. (In Russ.)
12. Moiseev S. V., Krylov V. I., Masterkova T. V., Yashkir V. A., Bunyatyan N. D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy for drug identification, characterization and quantification of impurities in substance of salicylic acid. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2014;(1):15–19. (In Russ.)
13. Kuz'mina N. E., Moiseev S. V., Yakupov I. Yu., Kuleshova S. I. Quantitative Determination of Major Active Components in Polymyxin B Medicinal Products by NMR Spectroscopy. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(2):206–212. (In Russ.). DOI: 10.30895/1991-2919-2025-15-2-206-212.
14. Sapon E. S., Lugin V. G., Sovastey O. G., Efremova A. A., Garipov R. M. Application of electrospray ionization HPLC-MS for qualitative analysis of cepholosporin antibiotics. *Bulletin of Kazan technological university*. 2014;17(17):136–138. (In Russ.)
15. Gottlieb H. E., Kotlyar V., Nudelman A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry*. 1997;62(21):7512–7515. DOI: 10.1021/jo971176v.
16. Zenkevich I. G., Ioffe B. V. Interpretation of mass spectra of organic compounds. Leningrad: Khimiya; 1986. P. 61–65. (In Russ.)

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.074

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2250

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и валидация аналитических методик количественного определения дабигатрана этексилата методами ВЭЖХ-ДМД и УФ-спектрофотометрии при проведении теста сравнительной кинетики растворения капсул дабигатрана в биорелевантной среде FaSSGF

Д. М. Девяткина[1, 2]✉, П. С. Мащенко[2, 3]✉✉, А. Д. Внутских[1], И. О. Девяткин[1, 2], Н. А. Прозорова[1, 3], А. В. Фотеева[1, 2]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Парма Клиникал». 614101, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Причальная, д. 1Б, корп. 3

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России). 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ФГАОУ ВО «ПГНИУ», ПГНИУ). 614068, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

✉ **Контактное лицо:** Девяткина Дарья М. **E-mail:** drklsnkv@yandex.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Мащенко Петр Сергеевич. **E-mail:** petlya11@mail.ru

ORCID: Д. М. Девяткина – https://orcid.org/0009-0009-1711-2862;
П. С. Мащенко – https://orcid.org/0000-0002-2259-7659;
А. Д. Внутских – https://orcid.org/0009-0000-3557-8804;
И. О. Девяткин – https://orcid.org/0009-0001-0759-6121;
Н. А. Прозорова – https://orcid.org/0000-0001-5755-4184;
А. В. Фотеева – https://orcid.org/0000-0002-3752-7848.

Статья поступила: 02.12.2025 **Статья принята в печать:** 10.02.2026 **Статья опубликована:** 13.02.2026

Резюме

Введение. Венозные тромбоэмболии и фибрилляция предсердий являются значимыми причинами сосудистой смертности. Антикоагулянтная терапия существенно снижает риск ишемического инсульта, а дабигатрана этексилат, относящийся к прямым ингибиторам тромбина, прочно вошел в клиническую практику. На российском рынке представлены воспроизведенные препараты дабигатрана этексилата в форме капсул, одним из наиболее критичных видов контроля качества для данной лекарственной формы является тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР). Использование биорелевантных сред для растворения позволяет достоверно прогнозировать поведение капсул *in vivo*. Для проведения ТСКР капсул дабигатрана этексилата исходя из фармакокинетических свойств наиболее подходящей средой является Fasted State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF).

Цель. Разработка и валидация аналитических методик количественного определения дабигатрана этексилата методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДМД) и спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (УФ-спектрофотометрия) при проведении ТСКР капсул, содержащих дабигатрана этексилат, в биорелевантной среде растворения FaSSGF.

Материалы и методы. Анализировали модельные растворы, содержащие пеллеты дабигатрана этексилата и вспомогательные вещества лекарственного препарата. Для хроматографического разделения использовали ВЭЖХ-ДМД Agilent 1260 Infinity II Series (США). Детектирование проводилось при длине волны 316 нм. Использовали колонку ZORBAX SB-C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм, предколонку ZORBAX SB-C18, 12,5 × 4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США). Для разработки и валидации метода УФ-спектрофотометрии использовали спектрофотометр СФ-2000 (Россия). Обработку первичных данных проводили с помощью программного обеспечения Open Lab CDS v. 2.7 для ВЭЖХ, «Сканирование для спектрофотометра СФ-2000» от ООО «ОКБ Спектр», версия 4.06.

Результаты и обсуждение. Подобраны оптимальные условия пробоподготовки, хроматографические и спектрофотометрические условия для количественной оценки дабигатрана этексилата, высвобождаемого в среду растворения FaSSGF, проведена валидация разработанных аналитических методик в диапазоне от 0,13 до 14,67 мкг/мл.

© Девяткина Д. М., Мащенко П. С., Внутских А. Д., Девяткин И. О., Прозорова Н. А., Фотеева А. В., 2026
© Devyatkina D. M., Mashchenko P. S., Vnutskikh A. D., Devyatkin I. O., Prozorova N. A., Foteeva A. V., 2026

Заключение. Аналитические методики обеспечивают воспроизводимые и достоверные результаты во всем заданном диапазоне и пригодны для количественного определения дабигатрана этексилата при проведении ТСКР в биорелевантной среде растворения FaSSGF.

Ключевые слова: дабигатрана этексилат, ВЭЖХ-ДМД, УФ-спектрофотометрия, ТСКР, биорелевантные среды растворения, валидация

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

Вклад авторов. Д. М. Девяткина и П. С. Мащенко придумали и руководили экспериментом. Д. М. Девяткина и И. О. Девяткин разработали и валидировали аналитические методики. Д. М. Девяткина и А. Д. Внутских участвовали в обработке данных и интерпретации результатов. Д. М. Девяткина, А. Д. Внутских, Н. А. Прозорова и А. В. Фотеева участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Девяткина Д. М., Мащенко П. С., Внутских А. Д., Девяткин И. О., Прозорова Н. А., Фотеева А. В. Разработка и валидация аналитических методик количественного определения дабигатрана этексилата методами ВЭЖХ-ДМД и УФ-спектрофотометрии при проведении теста сравнительной кинетики растворения капсул дабигатрана в биорелевантной среде FaSSGF. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):161–171. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2250

The development and validation of analytical methods for the quantitative determination of dabigatran etexilate by HPLC-DAD and UV spectrophotometry during a comparative dissolution kinetics test of dabigatran capsules in the biorelevant FaSSGF medium

Daria M. Devyatkina[1, 2]✉, Petr S. Mashchenko[2, 3]✉✉, Alena D. Vnutskikh[1], Igor O. Devyatkin[1, 2], Nadezhda A. Prozorova[1, 3], Alexandra V. Foteeva[1]

[1] Limited Liability Company "Parma Clinical". 1B/3, Prichalnaya str., Perm, Perm region, 614101, Russia
[2] Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (PSPA). 2, Polevaya str., Perm, Perm region, 614990, Russia
[3] Perm State University (PSU). 15, Bukireva str., Perm, Perm region, 614068, Russia

✉ **Corresponding author:** Daria M. Devyatkina. **E-mail:** drklsnkv@yandex.ru
✉✉ **Corresponding author:** Petr S. Mashchenko. **E-mail:** petlya11@mail.ru

ORCID: Daria M. Devyatkina – https://orcid.org/0009-0009-1711-2862;
Petr S. Mashchenko – https://orcid.org/0000-0002-2259-7659;
Alena D. Vnutskikh – https://orcid.org/0009-0000-3557-8804;
Igor O. Devyatkin – https://orcid.org/0009-0001-0759-6121;
Nadezhda A. Prozorova – https://orcid.org/0000-0001-5755-4184;
Alexandra V. Foteeva – https://orcid.org/0000-0002-3752-7848.

Received: 02.12.2025 **Accepted:** 10.02.2026 **Published:** 13.02.2026

Abstract

Introduction. Venous thromboembolism and atrial fibrillation are significant causes of vascular mortality. Anticoagulant therapy significantly reduces the risk of ischemic stroke, and dabigatran etexilate, a direct thrombin inhibitor, has become firmly established in clinical practice. There are several generic drug products of dabigatran etexilate capsules in Russia. Comparative dissolution kinetics test (CDKT) is one of the most critical quality control method for this dosage form. The use of biorelevant dissolution media can reliably predict the *in vivo* dissolution of the capsules. Based on the pharmacokinetic properties of dabigatran etexilate capsules, the most suitable medium is Fasted State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF).

Aim. Development and validation of analytical methods for the quantitative determination of dabigatran etexilate using high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and UV spectrophotometry during the CDKT of dabigatran etexilate capsules in the biorelevant dissolution medium FaSSGF.

Materials and methods. Model solutions containing dabigatran etexilate pellets and excipients of the drug product were analyzed. An Agilent 1260 Infinity II Series HPLC-DAD (USA) was used for chromatographic separation. Detection of dabigatran was performed at 316 nm wavelength. A ZORBAX SB-C18, 150 × 4.6 mm, 5 µm column with ZORBAX SB-C18, 12.5 × 4.6 mm, 5 µm guard column (Agilent Technologies, USA) were used. An SF-2000 spectrophotometer (Russia) was used for the development and validation of UV spectrophotometry analytical method. Data obtained was processed using Agilent OpenLab CDS v. 2.7 and OKB Spectr Scanning for spectrophotometer SF-2000 v. 4.06.

Results and discussion. Optimal conditions for sample preparation, chromatographic and spectrophotometric conditions were developed for the quantitative assessment of dabigatran etexilate released into the FaSSGF dissolution medium during CDKT. Developed analytical methods were validated in the range from 0.13 to 14.67 μg/ml.
Conclusion. Developed analytical methods provide reproducible and reliable results over the entire specified range thus are suitable for the quantitative determination of dabigatran etexilate during CDKT in the biorelevant FaSSGF dissolution medium.

Keywords: dabigatran etexilate, HPLC-DAD, UV-spectrophotometry, comparative dissolution kinetics test, biorelevant dissolution media, 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. Daria M. Devyatkina and Petr S. Mashchenko planned and manages the experiment. Daria M. Devyatkina and Igor O. Devyatkin developed and validated analytical methods. Daria M. Devyatkina and Alena D. Vnutskikh participated in data analysis and results interpretation. Daria M. Devyatkina, Alena D. Vnutskikh, Nadezhda A. Prozorova and Alexandra V. Foteeva wrote and edited the manuscript. Results were discussed by all authors.

For citation: Devyatkina D. M., Mashchenko P. S., Vnutskikh A. D., Devyatkin I. O., Prozorova N. A., Foteeva A. V. The development and validation of analytical methods for the quantitative determination of dabigatran etexilate by HPLC-DAD and UV spectrophotometry during a comparative dissolution kinetics test of dabigatran capsules in the biorelevant FaSSGF medium. *Drug development & registration*. 2026;15(1):161–171. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2250

ВВЕДЕНИЕ

Венозные тромбоэмболии являются третьей по распространенности причиной сосудистой смертности после инфаркта миокарда и инсульта [1]. Для лечения и профилактики этих состояний применяются лекарственные препараты (ЛП) из группы антикоагулянтов.

Дабигатрана этексилат – широко распространенный антикоагулянт, относящийся к прямым ингибиторам тромбина [2]. Исследование, проведенное в Индии, показывает, что 72 % экспертов рекомендуют дабигатрана этексилат как наиболее предпочтительный антикоагулянт [3]. Лекарственный препарат был одобрен в США и Канаде для профилактики тромбоэмболии у пациентов с фибрилляцией предсердий, в Европе и Канаде – для первичной профилактики венозной тромбоэмболии после крупных ортопедических операций [2]. В клинических исследованиях дабигатрана этексилат в дозировке 150 мг/сут значительно снижал риск инсульта по сравнению с варфарином [4].

На фармацевтическом рынке лекарственный препарат, содержащий дабигатрана этексилат (рисунок 1) в качестве действующего вещества, представлен в форме капсул. Для подтверждения эквивалентности воспроизведенного ЛП оригинальному ЛП могут быть использованы биорелевантные среды растворения в качестве дополнительных сред растворения, что существенно повышает точность прогнозирования *in-vivo*-поведения твердых пероральных лекарственных форм [5]. Дабигатрана этексилат по биофармацевтической классификационной системе относится к классу IIb [6].

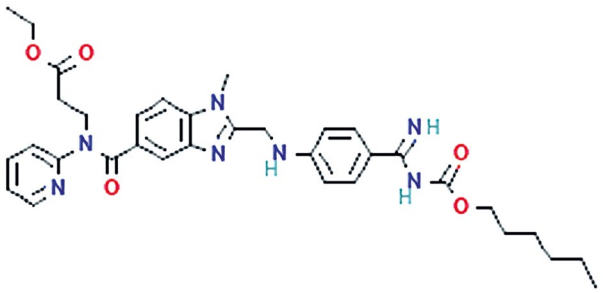


Рисунок 1. Структурная формула дабигатрана этексилата

Figure 1. Molecular structure of dabigatran etexilate

Результаты, полученные в ходе проведения клинических исследований, демонстрируют, что растворимость дабигатрана этексилата снижается на 70 % при повышении pH до 5,3 [7]. В исследовании по моделированию условий желудочно-кишечного тракта и их вариабельности при использовании биорелевантных сред растворения отмечено ухудшение растворимости препарата дабигатрана при pH выше 4 [8]. В связи с этим наиболее оптимальной биорелевантной средой растворения для контроля качества капсул, содержащих действующее вещество в виде дабигатрана этексилата, является Fasted State Simulated Gastric Fluid с pH 1,6 (FaSSGF, имитация желудочного сока натощак).

В связи с недавним появлением на российском рынке дженериков оригинального лекарственного препарата Прадакса® вопрос контроля качества воспроизведенных препаратов является актуальным.

Целью исследования является разработка и валидация аналитических методик количественного определения дабигатрана этексилата методами ВЭЖХ-ДМД и УФ-спектрофотометрии при проведении теста сравнительной кинетики растворения капсул, содержащих дабигатрана этексилат, в биорелевантной среде растворения FaSSGF.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во время проведения исследования были использованы следующие реактивы: метанол (для хроматографии, ООО «АКВАМЕТРИЯ», Россия), ацетонитрил (для хроматографии, FTSCI, Китай), хлороводородная кислота (х.ч., АО «ЛенРеактив», Россия), аммония ацетат (для хроматографии, Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия), натрия хлорид (х.ч., АО «ЛенРеактив», Россия), порошок 3F для приготовления биорелевантных сред (Biorelevant, QMB Innovation Centre, Великобритания, каталожный номер FFF02, содержит натрия таурохолат и фосфолипиды).

Объектами испытаний выступали пеллеты, содержащие действующее вещество [дабигатрана этексилата мезилата пеллеты, Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd., Китай, партия № 0000025816, срок годности до 09.2026, содержание дабигатрана этексилата после нанесения слоя действующего вещества на пеллеты – 36,74 % (масс./масс.)] и вспомогательные вещества (плацебо).

Вспомогательные вещества были переданы производителем капсул.

Для разработки и валидации методики использовали стандартный образец дабигатрана этексилата мезилата EP CRS, каталожный номер Y0002393, batch 1, с содержанием действующего вещества «как есть» 99,5 %. На момент проведения испытаний срок годности стандартного образца был действительным и проверялся путем обращения на официальный сайт производителя.

Приготовление биорелевантной среды растворения FaSSGF осуществляли в соответствии с инструкцией, приведенной на сайте производителя[1].

Оборудование

Методика с применением метода УФ-спектрофотометрии была разработана и валидирована на спектрофотометре СФ-2000 (Россия).

Разработка и валидация методики с применением метода ВЭЖХ-ДМД проводилась на высокоэффективном жидкостном хроматографе с диодно-матричным детектором Agilent 1260 Infinity II Series (США).

Обработку первичных данных проводили с помощью программного обеспечения Open Lab CDS v. 2.7 для ВЭЖХ, «Сканирование для спектрофотометра СФ-2000» от ООО «ОКБ Спектр», версия 4.06. Для статистической обработки использовались валидированные электронные таблицы, расчет результатов проводили с применением программного обеспечения Microsoft® Office Excel® версии 2007.

Условия УФ-спектрофотометрии

Кюветы кварцевые для спектрофотометра 10 × 10 мм. Измеряли оптическую плотность в максимуме поглощения при длине волны 323 нм и регистрировали УФ-спектр поглощения. В качестве раствора сравнения использовали 0,1 М хлороводородную кислоту.

Условия хроматографического разделения

Хроматографическая колонка: ZORBAX SB-C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм, Agilent Technologies, США.

Предколонка: ZORBAX SB-C18, 12,5 × 4,6 мм, 5 мкм, Agilent Technologies, США.

Подвижная фаза: подвижная фаза А – ацетонитрил; подвижная фаза В – раствор аммония ацетата.

Режим элюирования: подвижная фаза А : подвижная фаза В (%, об./об.) = 55 : 45.

Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.

Температура термостата колонки: 40 °С.

Объем вводимой пробы: 20 мкл.

Детектор: диодно-матричный, с возможностью записи спектра в диапазоне от 190 до 400 нм.

Детектирование: при длине волны 316 нм.

Ожидаемое время удерживания пика дабигатрана этексилата: 6 мин.

Время хроматографирования: 10 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка условий пробоподготовки

В качестве растворителя для получения исходных растворов действующего вещества была выбрана смесь ацетонитрила и метанола в соотношении 1 : 1 в связи с высокой растворимостью дабигатрана этексилата мезилата в органических растворителях [9].

При проведении ТСКР важным фактором является стабильность растворов, так как при проведении испытаний ЛП получаются длительные аналитические циклы, поэтому в процессе разработки было принято решение отказаться от органического растворителя и смеси воды с органическими растворителями в связи с тем, что наблюдалась неустойчивость растворов в процессе хранения.

Приготовление модельных растворов при проведении валидации осуществлялось в 3 стадии, которые имитировали получение испытуемого раствора при проведении ТСКР. Первое разведение представ-

[1] Biorelevant. Available at: https://biorelevant.com/ Accessed: 02.12.2025.

ляло собой высококонцентрированный раствор дабигатрана этексилата в смеси ацетонитрила и метанола 1 : 1.

Для второго разведения готовили раствор плацебо: вспомогательные вещества лекарственного препарата и капсулу из гипромеллозы помещали в колбу вместимостью 1 л, колбу на 2/3 заполняли биорелевантной средой FaSSGF, термостатированной до (37,0 ± 1,0) °C. Затем колбу помещали на перемешивающее устройство орбитального типа и перемешивали в течение 45 мин. В мерную колбу переносили аликвоту первого разведения раствора дабигатрана этексилата, объем раствора доводили термостатированной биорелевантной средой FaSSGF. Концентрация второго разведения была подобрана таким образом, что конечная концентрация растворов соответствовала концентрации дабигатрана этексилата в стакане при теоретическом высвобождении действующего вещества на 100 % при проведении ТСКР капсул дозировкой 150 мг. Для расчетов объем среды растворения в стакане принимали за 900 мл, что рекомендовано производителем биорелевантной среды.

Так как дозировка препарата является высокой, для получения точных и воспроизводимых результатов было предусмотрено третье разведение. Для доведения объема растворов третьего разведения использовали 0,1 М хлороводородную кислоту, так как при доведении растворов средой растворения была затруднена работа с растворами на СФ-2000. Кварцевые кюветы были подвержены быстрому загрязнению, что могло привести к искажению результатов и в дальнейшем к низкой воспроизводимости результатов анализов.

Объемы мерных колб и аликвот для второго и третьего разведения не изменялись, различные концентрации для обеспечения диапазона аналитической методики получались путем подбора навесок стандартного образца или пеллет дабигатрана этексилата. Состав модельной смеси для получения растворов с уровнем концентрации 100 % от номинальной концентрации испытуемых растворов соответствовал составу разрабатываемой лекарственной формы.

Разработка хроматографической и спектрофотометрической методик

Для разработки спектрофотометрической методики экспериментально определяли спектр поглощения дабигатрана этексилата в УФ-области. На серии стандартных растворов была подобрана конечная концентрация третьего разведения, которая обеспечивала необходимый уровень оптической плотности. На полученном спектре была выбрана длина волны, при которой поглощение оказалось максимальным – 323 нм (рисунок 2).

При подборе хроматографических условий руководствовались физико-химическими свойствами действующего вещества (таблица 1).

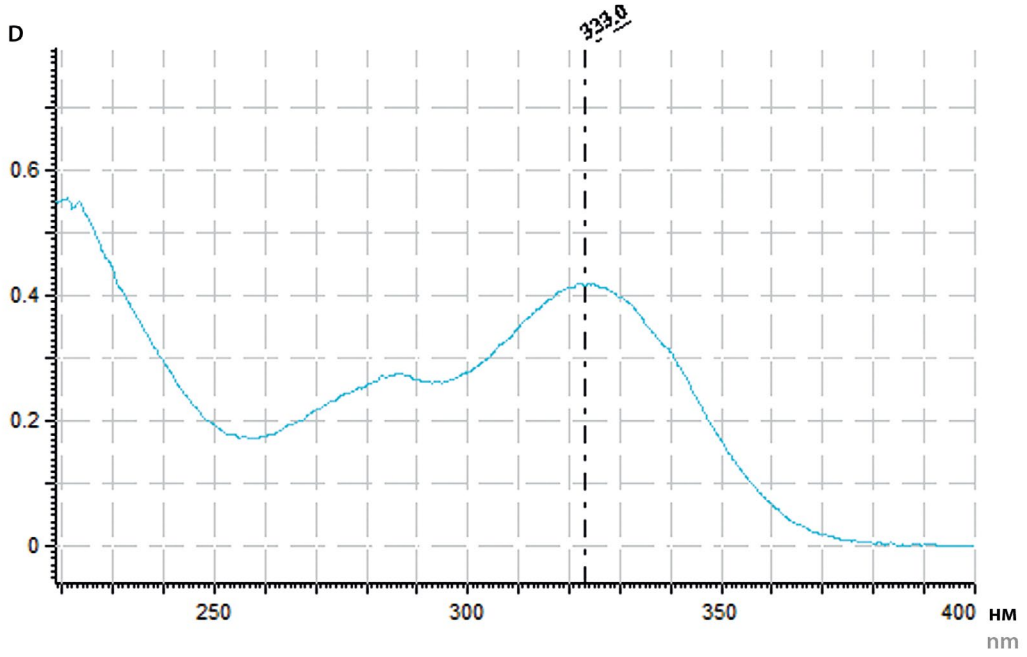


Рисунок 2. УФ-спектр поглощения раствора стандартного образца дабигатрана этексилата, полученный на СФ-2000

Figure 2. UV absorption spectrum of standard sample solution of dabigatran etexilate obtained at an SF-2000 spectrophotometer

Таблица 1. Физико-химические свойства дабигатрана этексилата мезилата

Table 1. Physico-chemical properties of dabigatran etexilate mesylate

Свойство Property	Значение Value
LogP	3,8
Молекулярная масса, г/моль Molecular weight, g/mol	627,7
pKa	4,25
Растворимость в воде, мг/мл Solubility in water, mg/ml	1,8

При разработке методики за основу были взяты условия из статьи [10]. Условия хроматографирования были доработаны исходя из требований к высокой чувствительности методики. Была подобрана другая хроматографическая колонка меньшей длины с аналогичным типом сорбента. Концентрация аммония ацетата в буферном растворе была повышена до 14 мМ. Соотношение подвижной фазы А и подвижной фазы В было изменено до 55:45 соответственно. Температура термостата колонки была увеличена до 40 °С. Детектирование велось при длине волны 316 нм (рисунок 3).

В условиях пробоподготовки были заменены растворители. Использовали те же растворы, которые анализировали на СФ-2000. При получении растворов путем разбавления второго разведения растворителем, представляющим из себя смесь компонентов подвижной фазы, форма пика была хуже, чем при использовании 0,1 М хлороводородной кислоты.

Валидация методик

Валидацию проводили согласно решению Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. (ред. от 12.04.2024 г.) № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», приложение 7, раздел 2, пункт 20. Были оценены валидационные характеристики: селективность, градуировочные кривые (линейность методики), правильность и повторяемость в течение 1 дня, правильность и прецизионность в разные дни, робастность, стабильность растворов при хранении.

Селективность

Для оценки селективности измеряли оптическую плотность и хроматографировали растворитель (0,1 М хлороводородную кислоту), растворы плацебо, раствор биорелевантной среды FaSSGF, рабочие градуировочные растворы (РГР) и рабочие растворы для контроля качества (РРКК) с теоретической концентрацией дабигатрана этексилата 100 %.

Оптическая плотность растворителя, раствора плацебо, биорелевантной среды растворения не превышала 0,0060.

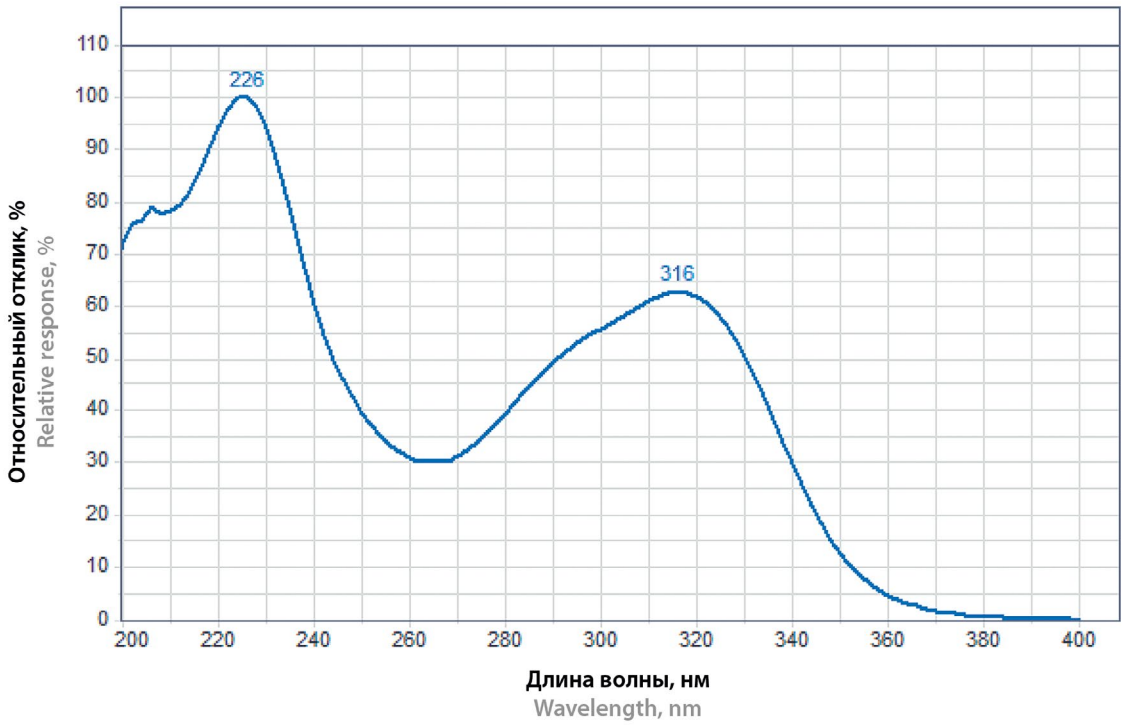


Рисунок 3. УФ-спектр поглощения, снятый в максимуме пика дабигатрана на хроматограмме раствора стандартного образца дабигатрана этексилата

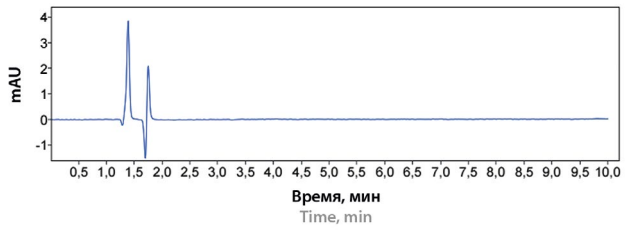
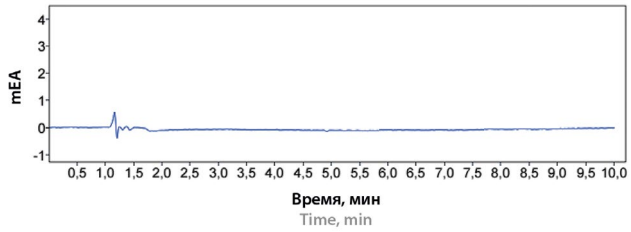
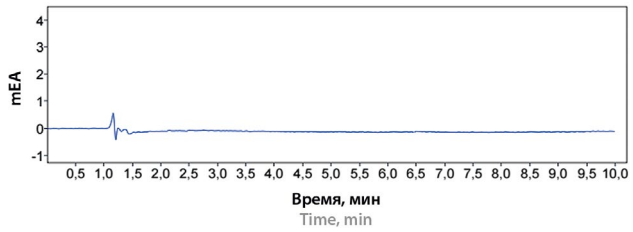
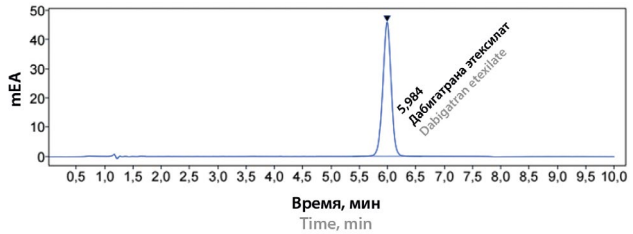
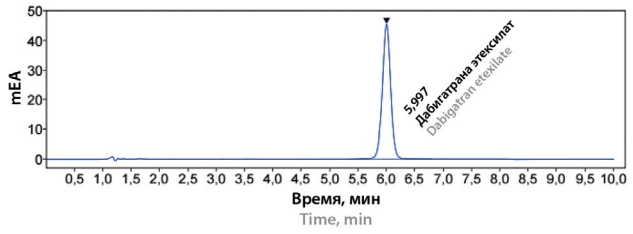
Figure 3. UV absorption spectrum obtained at the maximum of the dabigatran peak on a chromatogram of standard sample solution of dabigatran etexilate

На хроматограммах аналогичных растворов отсутствовали значимые пики со временем удерживания, близким ко времени удерживания дабигатрана этексилата (таблица 2).

Методика является селективной, так как компоненты растворителя, биорелевантной среды растворения и плацебо не мешают определению дабигатрана этексилата.

Таблица 2. Типичные хроматограммы и средние оптические плотности испытуемых растворов для определения селективности методики

Table 2. Typical chromatograms and average optical densities of the test solutions tofor determinnatione ofthe selectivity of the techniquemethod's selectivity

Наименование пробы Name of the sample	**Хроматограмма** Chromatogram	**Средняя оптическая плотность** Average optical density
Растворитель (0,1 М хлороводородная кислота) Solvent (0.1 M hydrochloric acid)		0,0021
Раствор плацебо Placebo solution		0,0054
Раствор биорелевантной среды растворения FaSSGF Solution of a biorelevant dissolution medium FaSSGF		0,0049
РГР с концентрацией дабигатрана этексилата 100 % Working calibration solution with 100 % concentration of dabigatran etexilate		0,4134
РРКК с концентрацией дабигатрана этексилата 100 % Working solution for quality control with 100 % concentration of dabigatran etexilate		0,4194

Линейность

Диапазон валидации методик задавали таким образом, чтобы охватить фактический диапазон применения методики. Восемь градуировочных уровней обеспечивали диапазон от 1,11 до 122,22 % (таблица 3).

Таблица 3. Итоги оценки РГР одного аналитического цикла

Table 3. Results of the evaluation of working calibration solutions of one analytical run

Номер РГР Number of the working calibration solution	Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, mcg/ml	Номинальная концентрация, % Nominal concentration, %	Фактическая концентрация, мкг/мл Actual concentration, mcg/ml	Средняя площадь пика Average peak area	Средняя оптическая плотность раствора Average optical density of the solution
1	0,13	1,11	0,13	5,57	0,0049
2	0,33	2,78	0,33	13,78	0,0118
3	0,67	5,56	0,67	27,53	0,0235
4	3,33	27,78	3,33	137,52	0,1165
5	6,67	55,56	6,66	275,12	0,2318
6	10,00	83,33	9,99	412,51	0,3496
7	12,00	100,00	11,98	495,06	0,4182
8	14,67	122,22	14,64	605, 12	0,5112

РГР готовили с использованием стандартного образца дабигатрана этексилата мезилата аналогично модельным испытуемым растворам без участия компонентов плацебо и капсулы.

Для каждого аналитического цикла была построена линейная зависимость отклика (площади пика или оптической плотности) от концентрации раствора (рисунки 4–5). Линейность методики считалась удовлетворительной, так как для каждого аналитического цикла коэффициент корреляции составил более 0,99 (таблицы 4–5).

Таблица 4. Результаты оценки линейности аналитической методики ВЭЖХ-ДМД

Table 4. Results of the evaluation of the HPLC-DAD analytical method's linearity

Аналитический цикл Analytical run	Коэффициент корреляции (*R*) Correlation coefficient (*R*)	Свободный член линейной зависимости (a) Intercept (a)	Угловой коэффициент линейной зависимости (b) Slope (b)
1	0,9999	–0,2002	41,1322
2	0,9996	–0,8075	40,9771
3	0,9999	0,4072	41,2874
4	0,9995	1,9016	40,3229
5	0,9996	2,4508	40,1601

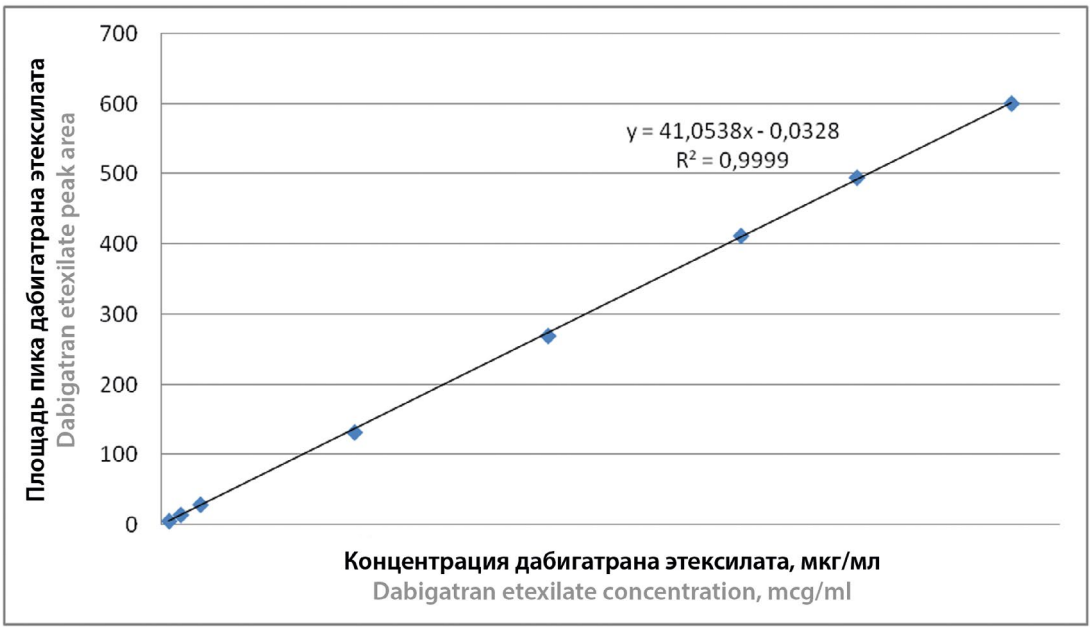


Рисунок 4. Градуировочный график зависимости отношения площади пика к концентрации дабигатрана этексилата

Figure 4. Calibration graph of the ratio of the peak area to the concentration of dabigatran etexylate

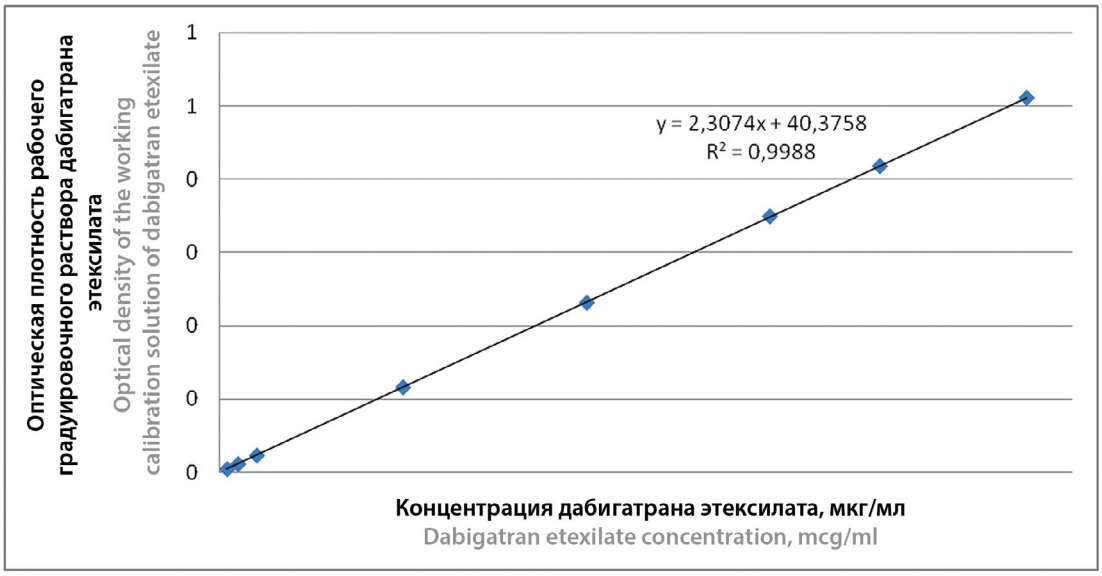


Рисунок 5. Градуировочный график зависимости отношения оптической плотности растворов к концентрации дабигатрана этексилата

Figure 5. Calibration graph of the ratio of the optical density of solutions to the concentration of dabigatran etexiylate

Таблица 5. Результаты оценки линейности аналитической методики с применением УФ-спектрофотометрии

Table 5. Results of the evaluation of UV spectrophotometry analytical method's linearity

Аналитический цикл Analytical run	Коэффициент корреляции (*R*) Correlation coefficient (*R*)	Свободный член линейной зависимости (a) Intercept (a)	Угловой коэффициент линейной зависимости (b) Slope (b)
1	0,9994	2,3074	40,3758
2	0,9994	2,5344	40,3512
3	0,9994	2,9781	40,3044
4	0,9998	1,4837	41,2690
5	0,9996	0,8763	41,1138

Правильность, повторяемость и прецизионность

Правильность методики оценивали по показателю «открываемость» для серии РРКК. Готовили по 3 раствора каждой концентрации. Открываемость (*R*) должна находиться в пределах 95–105 %. Для оценки повторяемости и внутрилабораторной прецизионности рассматривали относительное стандартное отклонение (RSD) полученных значений открываемости среди растворов одного уровня концентрации, а также оценивали значение RSD между аналитическими циклами. Во всех случаях относительное стандартное отклонение не превышало 3 % (таблицы 6–7).

Робастность

Устойчивость методик оценивали путем анализа раствора стандартного образца дабигатрана этексилата мезилата с уровнем концентрации 100 % от номинальной концентрации, изменяя условия проведения анализа. Параметрами для оценки устойчивости в случае метода ВЭЖХ-ДМД были выбраны: скорость потока подвижной фазы, температура термостата колонки, длина волны, соотношение органической и водной фаз. Для УФ-спектрофотометрии оценивали изменение длины волны. Методики анализа являются устойчивыми, изменения условий не оказывают значительного влияния на полученные результаты (таблица 8).

Стабильность растворов

Для оценки стабильности анализировали по три РГР и РРКК с уровнем концентрации дабигатрана этексилата 100 % до и после хранения. Исходные и рабочие растворы хранили при комнатной температуре в течение 24 ч, что превышает среднюю длительность аналитического цикла при проведении ТСКР лекарственного препарата по разработанной методике, затем анализировали и сравнивали полученные значения с результатами свежеприготовленных растворов. Относительное стандартное отклонение полученных концентраций для одних и тех же растворов до и после хранения составляло менее 3 % (таблица 9). Испытуемые растворы стабильны в течение 24 ч.

Таблица 6. Результаты оценки параметров «правильность и повторяемость в течение 1 дня» и «правильность и прецизионность в разные дни» методом ВЭЖХ-ДМД

Table 6. Results of the evaluation of the parameters "accuracy and repeatability within 1 day" and "accuracy and precision on different days" using the HPLC-DAD analytical method

Уровень концентрации, % от номинальной Concentration level (relative to nominal), %	Найдено, мкг Found, mcg	Найдено другим химиком, мкг Found by another chemist, mcg	$R_{ср.}$ первым химиком, % $R_{avg.}$ by the first chemist, %	$R_{ср.}$ вторым химиком, % $R_{avg.}$ by another chemist, %	RSD первого аналитического цикла, % RSD of the first analytical run, %	RSD между аналитическими циклами, % RSD between analytical runs, %
1,11	0,14	0,14	104,21	104,56	1,20	0,82
5,56	0,67	0,67	99,92	99,88	1,06	1,97
27,78	3,34	3,34	101,01	100,22	0,37	0,99
83,33	9,88	9,94	98,86	99,49	1,59	0,76
100,00	11,93	11,99	99,59	100,13	0,33	0,34
122,22	14,59	14,41	99,65	98,43	1,55	1,66

Таблица 7. Результаты оценки параметров «правильность и повторяемость в течение 1 дня» и «правильность и прецизионность в разные дни» методом УФ-спектрофотометрии

Table 7. Results of the evaluation of the parameters "accuracy and repeatability within 1 day" and "accuracy and precision on different days" using the UV spectrophotometry analytical method

Уровень концентрации, % от номинальной Concentration level (relative to nominal), %	Найдено, мкг Found, mcg	Найдено другим химиком, мкг Found by another chemist, mcg	$R_{ср.}$ первым химиком, % $R_{avg.}$ by the first chemist, %	$R_{ср.}$ вторым химиком, % $R_{avg.}$ by another chemist, %	RSD первого аналитического цикла, % RSD of the first analytical run, %	RSD между аналитическими циклами, % RSD between analytical runs, %
1,11	0,13	0,13	101,92	102,36	1,82	1,20
5,56	0,67	0,67	101,21	100,15	0,25	0,68
27,78	3,34	3,33	101,13	100,76	0,79	0,30
83,33	9,89	9,91	99,06	99,03	0,12	0,61
100,00	11,79	12,01	98,45	100,86	0,16	1,97
122,22	14,25	14,84	97,16	101,19	0,12	1,77

Таблица 8. Влияние изменения хроматографических условий и условий спектрофотометрирования на получаемые результаты

Table 8. Effect of changes in chromatographic and spectrophotometry conditions on the obtained results

Изменяемый параметр анализа, ед.изм. Modified analysis parameter, UOM	Расчитанная концентрация раствора, мкг/мл Calculated concentration of the solution, mcg/ml
Метод ВЭЖХ-ДМД HPLC-DAD method	
Стандартные условия Standard conditions	
–	12,07
Изменение скорости потока, мл Flow rate, ml	
0,9	12,05
1,1	12,04
Изменение температуры термостата колонки, °С Column thermostat temperature, °C	
38	12,08
42	12,07
Изменение длины волны при детектировании, нм Wavelength, nm	
314	12,10
318	12,05
Изменение соотношения органической и водной фаз Ratio of organic and aqueous phases	
53 : 47 (%, об./об.) 53 : 47 (%, v/v)	12,06
57 : 43 (%, об./об.) 57 : 43 (%, v/v)	12,01
Метод УФ-спектрофотометрии UV spectrophotometry method	
Стандартные условия Standard conditions	
–	12,04
Изменение длины волны, нм Wavelength, nm	
321	12,01
325	12,03

Таблица 9. Результаты изучения стабильности растворов

Table 9. Results of solutions stability study

Анализируемый раствор Solution	Найдено до хранения, мкг/мл Found before storage, mcg/ml	Найдено после хранения, мкг/мл Found after storage, mcg/ml	RSD, %
РГР № 1 Calibration solution № 1	11,91	12,06	1,77
РГР № 2 Calibration solution № 2	12,08	12,07	1,79
РГР № 3 Calibration solution № 3	12,04	12,08	1,51
РРКК № 1 Calibration solution № 1	12,06	11,93	1,40
РРКК № 2 Calibration solution № 2	11,99	12,14	0,43
РРКК № 3 Calibration solution № 3	11,97	12,01	0,29

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подобраны оптимальные условия пробоподготовки, хроматографические и спектрофотометрические условия для количественной оценки дабигатрана этексилата, высвобождаемого в среду растворения FaSSGF.

Проведена валидация аналитической методики в диапазоне от 1,11 до 122,22 % от номинального содержания дабигатрана этексилата в испытуемых растворах. Аналитические методики обеспечивают воспроизводимые и достоверные результаты в заданном диапазоне и пригодны для количественного определения дабигатрана этексилата при проведении ТСКР в биорелевантной среде растворения FaSSGF.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lutsey P. L., Zakai N. A. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. *Nature Reviews Cardiology*. 2023;20(4):248–262. DOI: 10.1038/s41569-022-00787-6.
2. Cheng J. W. M., Vu H. Dabigatran Etexilate: An Oral Direct Thrombin Inhibitor for the Management of Thromboembolic Disorders. *Clinical Therapeutics*. 2012;34(4):766–787. DOI: 10.1016/j.clinthera.2012.02.022.
3. Manjula S., Krishna Kumar M. Expert Opinion on the Usage of Novel Oral Anticoagulants in Clinical Conditions in Indian Settings. *Asian Journal of Research in Cardiovascular Diseases*. 2024;6(1):16–24.
4. Gunawardena T. Direct Oral Anticoagulants: A Review for the Non-Specialist. *Hematology Reports*. 2021;13(4):9239. DOI: 10.4081/hr.2021.9239.
5. Bourderi-Cambon A., Fadhlaoui K., Garrait G., Lainé E., Dhifallah I., Rossano M., Caisse P., Beyssac E. Improving In Vitro–In Vivo Correlation (IVIVC) for Lipid-Based Formulations: Overcoming Challenges and Exploring Opportunities. *Pharmaceutics*. 2025;17(10):1310. DOI: 10.3390/pharmaceutics17101310.
6. Chai F., Sun L., Ding Y., Liu X., Zhang Y., Webster T. J., Zheng C. A Solid self-nanoemulsifying System of the BCS Class IIb Drug Dabigatran Etexilate to Improve Oral Bioavailability. *Nanomedicine*. 2016;11(14):1801–1816. DOI: 10.2217/nnm-2016-0138.
7. Harada A., Ikushima I., Haranaka M., Yanagihara A., Nakayama D. Bioequivalence of a Newly Developed Dabigatran Etexilate Tablet Versus the Commercial Capsule and Impact of Rabeprazole-Induced Elevated Gastric pH on Exposure in Healthy Subjects. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2019;20(3):249–258. DOI: 10.1007/s40256-019-00377-x.
8. Staniszewska M., Myslitska D., Romański M. Polak S., Garbacz G., Dobosz J., Smoleński M., Paszkowska J., Danielak D. *In Vitro* Simulation of the Fasted Gastric Conditions and Their Variability to Elucidate Contrasting Properties of the Marketed Dabigatran Etexilate Pellet-Filled Capsules and Loose Pellets. *Molecular Pharmaceutics*. 2024;21(5):2456–2472. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.4c00025.
9. Yan Y., Li A., Si Z., Zhang X. Solubility measurement, correlation and molecular simulation of dabigatran etexilate mesylate polymorphs in five mono-solvents. *Journal of Molecular Liquids*. 2020;314:113676. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113676.
10. Bernardi R. M., D'Avila F. B., Todeschini V., Fröehlich P. E., Bergold A. M. A comparative study on the analytical performance of a charged aerosol detector and an ultraviolet detector for the RP-LC analysis of dabigatran etexilate in capsules. *Analytical Methods*. 2013;5(18):4777. DOI: 10.1039/c3ay40938d.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.072

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2137

Check for updates

CC BY 4.0

Стандартизация жидких водно-спиртовых извлечений из облепихи крушиновидной листьев

Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева✉

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»). 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Тринеева Ольга Валерьевна. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: Н. А. Ковалёва – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665;
О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 03.07.2025 **Статья принята в печать:** 09.02.2026 **Статья опубликована:** 13.02.2026

Резюме

Введение. Листья облепихи крушиновидной в настоящее время используются в фармации в качестве исходного сырья для производства лекарственного растительного препарата (ЛРП) «Гипорамин» противовирусного действия. В научной литературе представлены данные доклинических испытаний экстрактов из листьев, подтверждающие их противовоспалительную, антибактериальную, антиоксидантную, иммуномодулирующую активность, а также имеются данные о потенциальных свойствах гепатопротектора, что связано с фенольной, в том числе флавоноидной, фракцией листьев. Поэтому исследования возможности дополнительных путей внедрения изучаемого сырья в практическую фармацию, а также расширения ассортимента отечественных ЛРП, содержащих комплекс биологически активных веществ (БАВ) листьев, например в виде настоек и жидких экстрактов на основе листьев, с разработкой методик их стандартизации по целевой группе БАВ следует считать актуальными.

Цель. Целью исследования являлось получение и стандартизация водно-спиртовых извлечений из облепихи крушиновидной листьев.

Материалы и методы. Сравнительное исследование проводили для извлечений из высушенных листьев, приготовленных по типу настоек (1 : 5), полученных различными способами, и экстракта жидкого (1 : 1) по стандартным фармакопейным методикам. Все исследуемые извлечения готовили из листьев, заготовленных в 2024 году на территории Воронежской области, фенологической фазы развития, соответствующей стадии технической зрелости плодов. Проводилась разработка методик идентификации и количественного определения флавоноидов методами ТСХ и дифференциальной спектрофотометрии.

Результаты и обсуждение. По показателю «сухой остаток» наибольшее количество экстрактивных веществ показала настойка, полученная методом дробной мацерации. Жидкий экстракт демонстрировал самый высокий выход БАВ. Содержание тяжелых металлов не превышало нормативов, рекомендованных Государственной фармакопеей РФ. Содержание флавоноидов максимально было в экстракте жидком (1 : 1). С точки зрения эффективности использования сырья наилучшей формой является настойка, полученная методом перколяции.

Заключение. Получены опытные лабораторные образцы жидких водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной (настойки, экстракт жидкий), проведена их стандартизация по показателям, изложенным в нормативной документации, разработаны методики количественного определения флавоноидов. Методом ТСХ показан неодинаковый флавоноидный состав водно-спиртовых извлечений, в которые переходит от 11 до 18 БАВ группы флавоноидов. Наиболее высокое содержание флавоноидов отмечено для экстракта жидкого (1 : 1), что позволяет рекомендовать данную форму в качестве оптимальной из исследованных.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, *Hippophae rhamnoides* L., листья, настойки, жидкий экстракт, флавоноиды, ТСХ-профиль

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

Вклад авторов. Н. А. Ковалёва проводила заготовку и сушку сырья, получала опытные лабораторные образцы лекарственных форм, а также выполняла экспериментальные исследования по разработке методик стандартизации. Совместно с О. В. Тринеевой готовила текст статьи. О. В. Тринеева оказывала консультативную помощь по полученным результатам, писала разделы «Заключение» и «Результаты и обсуждение».

© Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., 2026
© Kovaleva N. A., Trineeva O. V., 2026

Для цитирования: Ковалёва Н. А., Тринеева О. В. Стандартизация жидких водно-спиртовых извлечений из облепихи крушиновидной листьев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):172–181. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2137

Standardization of liquid aqueous-alcoholic extracts from sea buckthorn leaves

Nataliya A. Kovaleva, Olga V. Trineeva✉

Voronezh State University. 1, Universitetskaya ploshchad, Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Olga V. Trineeva. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: Nataliya A. Kovaleva – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665;
Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 03.07.2025 **Accepted:** 09.02.2026 **Published:** 13.02.2026

Abstract

Introduction. Sea buckthorn leaves are currently used in pharmacy as a raw material for the production of the herbal medicinal product (HMP) "Giporamin" with antiviral action. The scientific literature contains data on preclinical trials of leaf extracts, confirming their anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant, immunomodulatory activities, and there are also data on the potential properties of a hepatoprotector, which is associated with the phenolic, including flavonoid, fraction of the leaves. Therefore, studies of the possibility of additional ways of introducing the studied raw materials into practical pharmacy, as well as expanding the range of domestic HMPs containing a complex of biologically active substances (BAS) of leaves, for example, in the form of tinctures and liquid extracts based on leaves, with the development of methods for their standardization according to the target group of BAS should be considered relevant.

Aim. The aim of the study was to obtain and standardize aqueous-alcoholic extracts from sea buckthorn leaves.

Materials and methods. A comparative study was conducted for extracts from dried leaves prepared as tinctures (1 : 5) obtained in various ways and liquid extract (1 : 1) according to standard pharmacopoeial methods. All the studied extracts were prepared from leaves harvested in 2024 in the Voronezh region, at the phenological phase of development corresponding to the stage of technical maturity of the fruits. Methods for the identification and quantitative determination of flavonoids using TLC and differential spectrophotometry were developed.

Results and discussion. According to the «Dry residue» indicator, the tincture obtained by fractional maceration showed the highest amount of extractive substances. The liquid extract demonstrated the highest yield of biologically active substances. The content of heavy metals did not exceed the standards recommended by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The content of flavonoids was maximum in the liquid extract (1 : 1). From the point of view of the efficiency of using raw materials, the best form is the tincture obtained by the percolation method.

Conclusion. Experimental laboratory samples of liquid aqueous-alcoholic dosage forms based on sea buckthorn leaves (tinctures, liquid extract) were obtained, their standardization was carried out according to the parameters set out in the regulatory documentation, and methods for the quantitative determination of flavonoids were developed. The TLC method showed a different flavonoid composition of aqueous-alcoholic extracts, which contain from 11 to 18 biologically active substances of the flavonoid group. The highest content of flavonoids was noted for the liquid extract (1 : 1), which allows us to recommend this form as the optimal one among those studied.

Keywords: sea buckthorn, *Hippophae rhamnoides* L., leaves, tinctures, liquid extract, flavonoids, TLC-profile

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. Nataliya A. Kovaleva prepared and dried the raw materials, obtained experimental laboratory samples of dosage forms, and also carried out experimental studies to develop standardization methods. She prepared the text of the article together with Olga V. Trineeva. Olga V. Trineeva provided consulting assistance on the obtained results, wrote the sections «Conclusion» and «Results and discussion».

For citation: Kovaleva N. A., Trineeva O. V. Standardization of liquid aqueous-alcoholic extracts from sea buckthorn leaves. *Drug development & registration*. 2026;15(1):172–181. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2137

ВВЕДЕНИЕ

Листья облепихи крушиновидной в настоящее время используются в фармации в качестве исходного сырья для производства лекарственного растительного препарата (ЛРП) «Гипорамин»[1], действующим началом которого является очищенный комплекс галлоэллаготаннинов с клинически подтвержденной противовирусной активностью [1–14]. Специфическими маркерными веществами данного комплекса считаются представители группы дубильных веществ казуаринин, казуариктин, стриктинин, изостриктинин и др. [4–14]. Тем не менее данное сырье пока не имеет фармакопейной статьи (ФС) в Государственной фармакопее РФ (ГФ РФ)[2]. Однако потенциал возможных направлений использования данного лекарственного растительного сырья (ЛРС) ввиду его богатого химического состава [15–21], представленного также флавоноидами, пигментами, стеринами, витаминами и микроэлементами, недостаточно реализован в настоящее время, что требует дополнительных исследований.

Значительные площади культивирования и естественных зарослей облепихи крушиновидной, по данным литературы насчитывающие на территории РФ более 200 га [22], позволяют утверждать, что листья данного растения не в полной мере востребованы фармацевтической промышленностью и являются пока побочным продуктом при массовой заготовке фармакопейного вида сырья – плодов. По данным авторов [23], ежегодный запас листьев облепихи только на Большом Кавказе составляет 3–5 т/год. Ресурсоведческие аспекты оценки ежегодных сырьевых запасов листьев на всей территории РФ (в культуре и дикорастущем виде) пока в литературе не обсуждены.

Жидкие водно-спиртовые лекарственные формы (ЛФ) на основе ЛРС характеризуются простотой получения, легким способом дозирования, ценовой доступностью и, как следствие, являются востребованными потребителями. В научной литературе представлены данные доклинических испытаний экстрактов из листьев (водных и спиртовых), подтверждающих их противовоспалительную, антибактериальную, антиоксидантную, иммуномодулирующую активность, а также имеются данные о потенциальных свойствах гепатопротектора [24], что, по мнению авторов, связано с фенольной, в том числе флавоноидной, фракцией листьев. Поэтому исследования возможности дополнительных путей внедрения изучаемого сырья в практическую фармацию, а также расширения ассортимента отечественных ЛРП, содержащих комплекс биологически активных веществ (БАВ) листьев, например в виде настоек и жидких экстрактов на основе листьев, с разработкой методик их стандартизации по целевой группе БАВ следует считать актуальными.

Цель работы – получение и стандартизация водно-спиртовых извлечений из облепихи крушиновидной листьев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сравнительное исследование проводили для извлечений из высушенных листьев, приготовленных по типу настоек (1:5), полученных различными способами (мацерации, дробной мацерации и перколяции), и экстракта жидкого (1:1) по стандартным фармакопейным методикам (ОФС.1.4.1.0019 «Настойки» и ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты» ГФ РФ XV). В качестве экстрагента при получении спиртосодержащих форм использовали спирт этиловый с концентрацией 70 %, как наилучший для извлечения флавоноидов, что было показано нами ранее при разработке методики их количественного определения в ЛРС [25]. Все исследуемые извлечения готовили из листьев фенологической фазы развития, соответствующей стадии технической зрелости плодов, выбранной ранее в качестве рекомендуемой по результатам комплексного фитохимического исследования для заготовки данного ЛРС [25]. Сырье заготавливали от мужских и женских растений в 2024 году на территории Воронежской области. В сырье предварительно определяли содержание суммы флавоноидов по ранее разработанной и валидированной спектрофотометрической методике [25]. Проводилась разработка методик идентификации и количественного определения одной из основных целевых групп БАВ листьев в извлечениях – флавоноидов [26, 27]. Также оценивали их выход в полученные лабораторные образцы ЛФ по отношению к содержанию в исходном сырье.

Стандартизацию извлечений дополнительно проводили по показателям «описание», «сухой остаток», «спирт этиловый», «тяжелые металлы» на основании требований соответствующих ОФС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемых извлечениях проводили количественное определение флавоноидов как целевой группы БАВ, для чего разрабатывались методики. Расчет суммы проводили в пересчете на лютеолин, как и для исходного сырья, по величине удельного показателя поглощения данного флавоноида в комплексе с алюминия хлоридом (АО «ВЕКТОН», Россия), представленного в литературе и равного 549,41. Максимум поглощения на дифференциальном спектре анализируемых извлечений с комплексообразователем наблюдался при 400 ± 2 нм, что характерно для продукта реакции лютеолина с алюминия хлоридом. Статистическая обработка данных проведена в соот-

[1] Регистр лекарственных средств России. Доступно по: https://www.rlsnet.ru/drugs/giporamin-9658. Ссылка активна на 27.06.2025.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. XV издание. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/. Ссылка активна на 28.06.2025.

ветствии с рекомендациями ОФС ГФ РФ XV издания при использовании ПО Microsoft Office Excel.

Методики определения суммы флавоноидов в ЛФ в пересчете на лютеолин: 1 мл ЛФ помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 5 мл 5%-го спиртового (70%-го) раствора алюминия хлорида, оставляли на 10 мин и далее прибавляли 1 мл кислоты уксусной 3%-й. Полученный раствор доводили до метки спиртом этиловым 70%-м, перемешивали и оставляли на 30 мин при дневном освещении (исследуемый раствор). Жидкий экстракт предварительно разводили в пять раз спиртом этиловым 70%-м ввиду очень высокого содержания БАВ. Параллельно готовили раствор сравнения аналогично испытуемому раствору без добавки аликвоты раствора алюминия хлорида. Через 30 мин измеряли оптическую плотность исследуемых растворов на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно соответствующих растворов сравнения. Вид полученных спектров поглощения приведен на рисунке 1. Содержание суммы флавоноидов (X, %) в пересчете на лютеолин в полученных образцах ЛФ вычисляли по формулам:

для настоек:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{E^{1\%}_{1\,см} \cdot 100 \cdot a \cdot l},$$

для жидкого экстракта:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5}{E^{1\%}_{1\,см} \cdot 100 \cdot a \cdot l},$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора; $E^{1\%}_{1\,см}$ – удельный показатель поглощения лютеолина в комплексе с алюминия хлоридом, равный 549,41; a – объем ЛФ, взятый для определения, мл; l – толщина слоя в кювете, см.

Результаты стандартизации изучаемых ЛФ приведены в таблице 1. По показателю «сухой остаток» наибольшее количество экстрактивных веществ среди настоек показала настойка, полученная методом дробной мацерации. Жидкий экстракт демонстрировал самый высокий выход БАВ. Содержание тяжелых металлов не превышало нормативов, рекомендованных в ОФС «Настойки» и «Экстракты» ГФ РФ. Содержание флавоноидов максимально было в экстракте жидком (1 : 1).

Исследование флавоноидного состава анализируемых извлечений осуществлено методом ТСХ по методике, описанной ранее для ЛРС [28]. Вид хроматограмм, полученных при нанесении 1 мкл исследуемых образцов, приведен на рисунке 2, параметры эффективности разделения – в таблице 2.

В ранее подобранных для исследования состава флавоноидов в сырье условиях при анализе ЛФ также наблюдается удовлетворительное разделение зон на хроматограммах (коэффициент разрешения двух рядом расположенных хроматографических зон больше 1,0, стремится к 1,5) (таблица 2).

При апробации методики для настоек (1 : 5) установлено, что оптимальным объемом пробы следует считать 1–3 мкл, а вид хроматографического профиля не зависит от способа получения настойки (мацерация, дробная мацерация или перколяция). На хро-

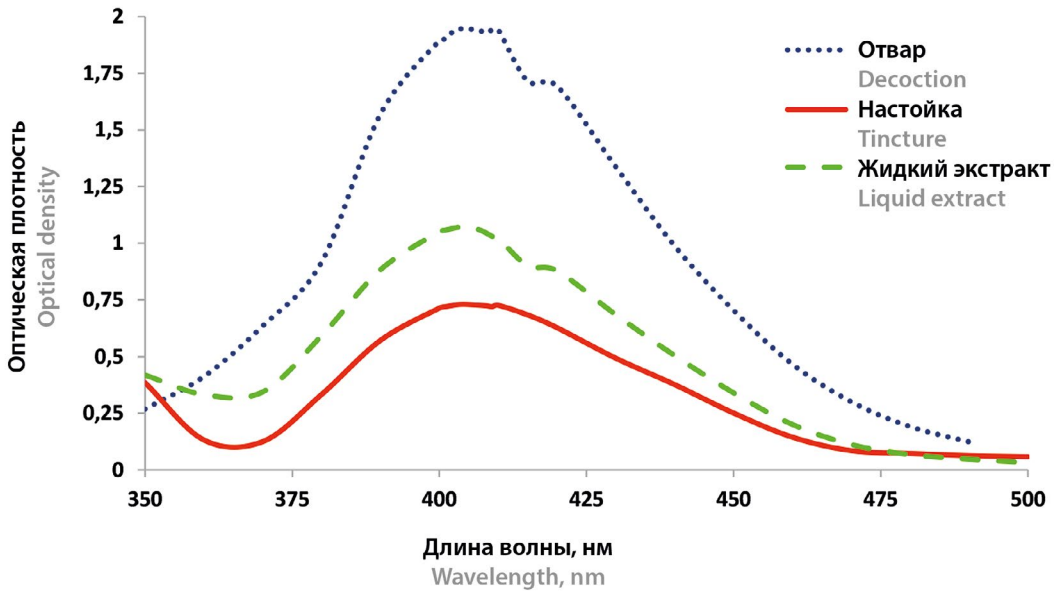


Рисунок 1. Вид дифференциальных спектров поглощения полученных образцов лекарственных форм с добавкой алюминия хлорида

Figure 1. Type of differential absorption spectra of the obtained samples of dosage forms with the addition of aluminum chloride

Таблица 1. Результаты стандартизации лабораторных образцов ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной

Table 1. Results of standardization of laboratory samples of medicinal products based on sea buckthorn leaves

Показатель Indicator	**Настойка (простая мацерация) 1 : 5** Tincture (simple maceration) 1 : 5	**Настойка (дробная мацерация) 1 : 5** Tincture (fractional maceration) 1 : 5	**Настойка (перколяция) 1 : 5** Tincture (percolation) 1 : 5	**Экстракт жидкий 1 : 1 (перколяция)** Liquid extract 1 : 1 (percolation)
Описание Description	**Непрозрачная, опалесцирующая, коричневато-зеленая жидкость со специфическим характерным запахом** Opaque, opalescent, brownish-green liquid with a specific characteristic odor			**Непрозрачная, опалесцирующая, черно-коричневая жидкость с сильным специфическим характерным запахом** Opaque, opalescent, black-brown liquid with a strong specific characteristic odor
Сухой остаток, % Dry residue, %	3,77 ± 0,05	4,76 ± 0,04	3,93 ± 0,03	18,17 ± 0,10
Спирт этиловый, об.% Ethyl alcohol, vol.%	64,0	62,27	60,0	67,0
Тяжелые металлы, % Heavy metals, %	Не более 0,001 Not more than 0.001			Не более 0,01 Not more than 0.01
Сумма флавоноидов, % Total flavonoids, %	0,094 ± 0,004	0,128 ± 0,003	0,132 ± 0,001	0,489 ± 0,002

Таблица 2. Параметры эффективности хроматографического разделения флавоноидов исследуемых опытных образцов ЛФ листьев облепихи крушиновидной

Table 2. Parameters of the efficiency of chromatographic separation of flavonoids of the studied experimental samples of sea buckthorn leaf LF

№ зоны Zone No.	**Настойка (1 мкл)** Tincture (1 µl)			**Жидкий экстракт (1 мкл при разведении 1 : 5)** Liquid extract (1 µl at 1 : 5 dilution)		
	R_f ± 0,02	**α***	***R*****	**R_f ± 0,02**	**α***	***R*****
1	0,02	49,00	3,13	0,02	49,00	2,58
2	0,06	15,67		0,05	19,00	
3	0,18	4,56	3,44	0,16	5,25	3,62
4	0,24	3,17	1,44	0,22	3,55	1,48
5	0,29	2,45	1,29	0,28	2,57	1,38
6	0,33	2,03	1,21	0,32	2,13	1,21
7	0,37	1,70	1,19	0,39	1,56	1,37
8	0,42	1,38	1,23	0,42	1,38	1,13
9	0,51	0,96	1,44	0,50	1,00	1,38
10	0,67	0,49	1,96	0,68	0,47	2,13
11	0,90	0,11	4,45	0,90	0,11	4,27
12	0,98	0,02	5,50	0,98	0,02	5,50

Примечание. * α – селективность разделения; ** *R* – разрешение двух хроматографических зон [29, 30].

Note. * α – separation selectivity; ** *R* – resolution of two chromatographic zones [29, 30].

матограммах в УФ-свете после проявления 10%-м спиртовым раствором NaOH или 5%-м спиртовым раствором алюминия хлорида наблюдали 12 зон, в том числе зону хлорофилловой природы (характерная флуоресценция), а также неидентифицированные зоны группы флавоноидов. Зона со значением величины $R_f = 0,99 \pm 0,01$ была отнесена к хлорофилловым соединениям (зеленая окраска в видимом свете и розовая – в УФ-свете). При сравнении величин R_f полученных хроматографических зон с достоверным стандартным образцом была идентифицирована зона рутина ($R_f = 0,52 \pm 0,02$).

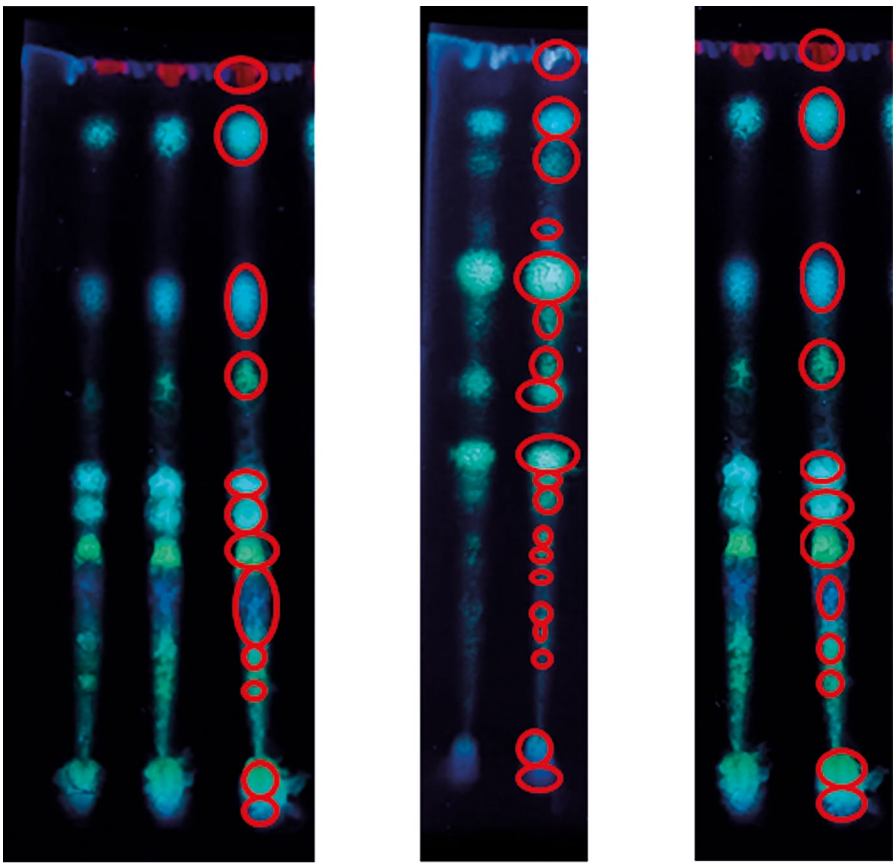


Рисунок 2. Вид хроматограмм, полученных при нанесении:
А – 1–3 мкл настойки; Б – 1 мкл жидкого экстракта, В – 3 мкл жидкого экстракта, разведенного предварительно в 5 раз

Figure 2. Type of chromatograms obtained upon application:
A – 1–3 µl of tincture; B – 1 µl of liquid extract, C – 3 µl of liquid extract, pre-diluted 5 times

Применение ТСХ-методики для жидкого экстракта (1:1) показало, что при нанесении 1 мкл вид хроматографического профиля флавоноидов был полностью идентичен профилю сырья [27]. На хроматограммах наблюдали 19 зон, в том числе зону хлорофилловой природы, а также 18 зон группы флавоноидов. Однако зоны расположены плотно друг за другом, что может затруднить оценку. При разведении экстракта в 5 раз спиртом этиловым 70%-м наблюдали 12 зон, в том числе зону хлорофилловой природы, а также 11 зон группы флавоноидов. Вид хроматограмм, полученных при нанесении 1 мкл экстракта и 1–3 мкл разведенного экстракта, приведен на рисунке 2, параметры эффективности разделения – в таблице 2.

По каждому виду полученных извлечений составлен материальный баланс по действующим веществам (таблица 3), отражающий эффективность экстракции БАВ из сырья.

С точки зрения эффективности использования сырья наилучшей формой является настойка, полученная методом перколяции. По результатам проведенных исследований оптимальной жидкой ЛФ на основе листьев может быть признан экстракт жидкий (1:1), так как он содержит наибольшее количество флавоноидов в составе полифенольного комплекса, определяющего некоторые виды фармакологической активности данного растительного сырья.

В соответствии с рекомендуемыми для взрослых величинами суточного потребления[1] лютеолина для восполнения адекватного уровня могут быть рекомендованы следующие режимы дозирования полученных опытных образцов ЛФ (таблица 4).

[1] Методические рекомендации МР 2.3.1.1915-04 «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 02.07.2004). Доступно по: https://base.garant.ru/4180742/. Ссылка активна на 27.06.2025.

Таблица 3. Материальный баланс по флавоноидам для полученных лабораторных образцов ЛФ

Table 3. Material balance for flavonoids for the obtained laboratory samples of the medicinal product

Взято ЛРС, г Taken MPM, g	**Содержание флавоноидов в ЛРС, г** Flavonoid content in MPM, g	**Получено ЛФ, мл** Received LF, ml	**Содержание флавоноидов в ЛФ, г** Flavonoid content in LF, g
Настойка (1 : 5), метод перколяции Tincture (1 : 5), percolation method			
10,00	0,07227	45	0,0594
Всего Total	0,07227	Потери Losses Всего Total	0,01287 0,07227
Эффективность экстракции Extraction efficiency	Выход (степень использования ЛРС), % = 82,19 Output (degree of utilization of MPM), % = 82.19 Расходный коэффициент = 1,22 Expense ratio = 1.22 Остаточное содержание БАВ в ЛРС, % = 17,81 Residual content of BAS in MPM, % = 17.81		
Жидкий экстракт (1 : 1) Liquid extract (1 : 1)			
50,00	0,3635	50	0,24425
Всего Total	0,3635	Потери Losses Всего Total	0,11925 0,3635
Эффективность экстракции Extraction efficiency	Выход (степень использования ЛРС), % = 67,19 Output (degree of utilization of MPM), % = 67.19 Расходный коэффициент = 1,45 Expense ratio = 1.45 Остаточное содержание БАВ в ЛРС, % = 32,81 Residual content of BAS in MPM, % = 32.81		
Настойка (1 : 5), метод мацерации Tincture (1 : 5), maceration method			
10,00	0,07227	40	0,0376
Всего Total	0,07227	Потери Losses Всего Total	0,03467 0,07227
Эффективность экстракции Extraction efficiency	Выход (степень использования ЛРС), % = 52,03 Output (degree of utilization of MPM), % = 52.03 Расходный коэффициент = 1,92 Expense ratio = 1.92 Остаточное содержание БАВ в ЛРС, % = 47,97 Residual content of BAS in MPM, % = 47.97		
Настойка (1 : 5), метод дробной мацерации Tincture (1 : 5), fractional maceration method			
10,00	0,07227	40	0,0512
Всего Total	0,07227	Потери Losses Всего Total	0,02107 0,07227
Эффективность экстракции Extraction efficiency	Выход (степень использования ЛРС), % = 70,85 Output (degree of utilization of MPM), % = 70.85 Расходный коэффициент = 1,41 Expense ratio = 1.41 Остаточное содержание БАВ в ЛРС, % = 29,15 Residual content of BAS in MPM, % = 29.15		

Таблица 4. Рекомендации по режиму дозирования полученных опытных образцов ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной

Table 4. Recommendations for the dosage regimen of the obtained experimental samples of medicinal products based on sea buckthorn leaves

Опытные образцы Prototypes	**Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на лютеолин), %** Content of total flavonoids (in terms of luteolin), %	**Режим дозирования** Dosage regimen
Настойка (перколяция) 1 : 5 Tincture (percolation) 1 : 5	0,132 ± 0,001	От 4 до 12 мл настойки (прием по 40–50 капель 3 раза в день) From 4 ml to 12 ml of tincture (take 40–50 drops 3 times a day)
Жидкий экстракт (1 : 1) Liquid extract (1 : 1)	0,489 ± 0,002	От 1 мл до 3 мл экстракта (прием по 20 капель 3 раза в день) From 1 ml to 3 ml of extract (take 20 drops 3 times a day)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, получены опытные лабораторные образцы жидких водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной (настойки, экстракт жидкий), проведена их стандартизация по показателям, изложенным в нормативной документации, разработаны методики количественного определения флавоноидов. Методом ТСХ показан неодинаковый флавоноидный состав водно-спиртовых извлечений, в которые переходит от 11 до 18 БАВ группы флавоноидов. Наиболее высокое содержание флавоноидов отмечено для экстракта жидкого (1 : 1), что позволяет рекомендовать данную форму в качестве оптимальной из исследованных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В. И. Культура облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) как источник сырья для производства препарата «Гипорамин». *Химико-фармацевтический журнал*. 2007;41(8):19–21.
2. Бортникова В. В. Экспериментальное изучение безопасности гипорамина – нового фитопрепарата противовирусного действия. *Биомедицина*. 2011;3:106–108.
3. Шейченко О. П., Толкачев О. Н., Шейченко В. И., Шипулина Л. Д., Вичканова С. А., Быков В. А. Способ получения противовирусного препарата «Гипорамин» (варианты). Патент РФ на изобретение № 2197978C1. Заявл. 07.06.2001. Опублик. 10.02.2003. Доступно по: https://patenton.ru/patent/RU2197978C1. Ссылка активна на 27.06.2025.
4. Ферубко Е. В., Трумпе Т. Е., Курманова Е. Н., Колхир В. К., Сидельникова Г. Ф., Громакова А. И. Использование фитопрепаратов ФГБНУ ВИЛАР в медицине. *Вопросы биологической, медицинской и фармакологической химии*. 2016;6(19):11–15.
5. Enkhtaivan G., John K. M. M., Pandurangan M., Hur J. H., Leutou A. S., Kim D. H. Extreme effects of Seabuckthorn extracts on influenza viruses and human cancer cells and correlation between flavonol glycosides and biological activities of extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(7):1646–1656. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.01.004.
6. Kim S.-J., Hwang E., Yi S. S., Song K. D., Lee H.-K., Heo T.-H., Park S.-K., Jung Y. J., Jun H. S. Sea Buckthorn leaf extract inhibits glioma cell growth by reducing reactive oxygen species and promoting apoptosis. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2017;182(4):1663–1674. DOI: 10.1007/s12010-017-2425-4.
7. Kubczak M., Khassenova A. B., Skalski B., Michlewska S., Wielanek M., Sklodowska M., Aralbayeva A. N., Nabiyeva Z. S., Murzakhmetova M. K., Zamaraeva M., Bryszewska M., Ionov M. *Hippophae rhamnoides* L. leaf and twig extracts as rich sources of nutrients and bioactive compounds with antioxidant activity. *Scientific Reports*. 2022;12(1):1095. DOI: 10.1038/s41598-022-05104-2.
8. Kumar M. S. Y., Dutta R., Prasad D., Misra K. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant. *Food Chemistry*. 2011;127(3):1309–1316. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.088.
9. Ma X., Moilanen J., Laaksonen O., Yahg W., Tenhu E., Yang B. Phenolic compounds and antioxidant activities of tea-type infusion processed from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *Food Chemistry*. 2019;272:1–11. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.08.006.
10. Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Kazaki K. Casuariin, stachyurin and strictinin, new ellagitannins from Casuarina stricta and Stachyurus praecox. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1982;30(2):766–769. DOI: 10.1248/cpb.30.766.
11. Skalski B., Kontek B., Olas B., Zuchowski J., Stochmal A. Phenolic fraction and nonpolar fraction from sea buckthorn leaves and twigs: Chemical profile and biological activity. *Future Medicinal Chemistry*. 2018;10(20):2381–2394. DOI: 10.4155/fmc-2018-0144.
12. Suvanto J., Tähtinen P., Valkamaa S., Engström M. T., Karonen M., Salminen J.-P. Variability in Foliar ellagitannins of Hippophae rhamnoides L. and identification of a new ellagitannin, Hippophaenin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(3):613–620. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04834.
13. Yoshida T., Hatano T., Ito H., Okuda T. Chemical and biological perspectives of ellagitannin oligomers from medicinal plants. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2000;23:395–453. DOI: 10.1016/S1572-5995(00)80134-9.

14. Yoshida T., Tanaka K., Chen X.-M., Okuda T. Tannins from *Hippophae rhamnoides*. *Phytochemistry*. 1991;30(2):663–666. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83748-A.
15. Айтуарова А. Ш., Жусупова Г. Е. Качественная и количественная оценка состава биологически активных веществ надземной части растения вида *Hippophaë rhamnoides* L. *Известия научно-технического общества «КАХАК»*. 2015;4(51):4–10.
16. Тарасов А. В., Бухаринова М. А., Хамзина Е. И. Определение антиоксидантной активности водных экстрактов некоторых растений Уральского региона. *Химия пищи и гигиена питания*. 2018;3(2):31–38. DOI: 10.29141/2500-1922-2018-3-2-5.
17. Мурзахметова М. К., Утегалиева Р. С., Аралбаева А. Н., Лесова Ж. Т. Исследование антиоксидантных и мембранопротекторных свойств экстрактов облепихи. *Actualscience*. 2015;1(5(5)):26–28.
18. Карматов И. Д., Букаев М. К. Облепиха как адаптогенное, повышающее физическую силу лекарственное растение. *Биология и интегративная медицина*. 2018;6(23):37–47.
19. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S. C., Sharma M., Singh S., Kumar H. T., Singh A. K., Nivsarkar M., Kaushik M. P., Sawhney R. C., Chaurasia O. P., Prasad G. B. K. S. Protective effect of ethanolic and water extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(10):821–831.
20. Usha T., Middha S. K., Goyal A. K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. Molecular docking studies of anti-cancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research*. 2014;28(5):406–415. DOI: 10.7555/JBR.28.20130110.
21. Saggu S., Divekar H. M., Gupta V., Sawhney R. C., Banerjee P. K., Kumar R. Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45(4):609–617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
22. Богомолова Н. И., Лупин М. В. Уровень биологического потенциала продуктивности облепихи крушиновидной в естественных и промышленных насаждениях России. *Вестник аграрной науки*. 2021;6(93):62–67. DOI: 10.17238/issn2587-666X.2021.6.62.
23. Новрузов Э. Н., Мамедов З. Г., Мустафаева Л. А., Мирюсифова Х. М., Зейналова А. М. Состав и содержание флавоноидов листьев *Hippophae rhamnoides* L., произрастающих в Азербайджане. *Химия растительного сырья*. 2018;3:209–214. DOI: 10.14258/jcprm.2018033772.
24. Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Бузлама А. В., Кузнецов А. Ю. Фармакологическая активность облепихи крушиновидной листьев: *in silico* и *in vivo*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):174–188. DOI 10.33380/2305-2066-2023-12-3-174-188.
25. Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Чувикова И. В., Сливкин А. И. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2):216–226. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-531.
26. Кабанов Д. С. Качественный состав и противоопухолевое действие полифенольных соединений из листьев *Hippophae rhamnoides* L. при использовании разных экстрагентов (мини-обзор). В сб.: Сборник материалов Международной конференции «Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения». 2024. С. 408–413.
27. Кабанов Д. С., Рубцова Т. А., Балеев Д. Н. Влияние гидролизуемых таннинов из листьев *Hippophae rhamnoides* L. на метаболическую активность кератиноцитов человека (HaCaT). В сб.: Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции «Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов». 2023. С. 349–357.
28. Тринеева О. В., Ковалёва Н. А., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Применение ТСХ для оценки профиля флавоноидов листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023;23(4):547–557. DOI: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11564.
29. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир; 1999. 405 с.
30. Рудаков О. Б., Востров И. А., Федоров С. В., Филиппов А. А., Селеменев В. Ф., Приданцев А. А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей; 2004. 528 с.

REFERENCES

1. Morozov V. I. Selecting sea buckthorn culture as a source of raw plant material for manufacturing Giporamin preparation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2007;41(8):19–21. (In Russ.)
2. Bortnikova V. V. Experimental study safety of hyporamine – a new antiviral fitopreparation. *Biomedicine*. 2011;3:106–108. (In Russ.)
3. Sheychenko O. P., Tolkachev O. N., Sheychenko V. I., Shipulina L. D., Vichkanova S. A., Bykov V. A. Method for producing the antiviral drug «Giporamin» (variants). Russian Federation Patent RUS No. 2197978C1. Claimed 07.06.2001. Published 10.02.2003. Available at: https://patenton.ru/patent/RU2197978C1. Accessed: 27.06.2025. (In Russ.)
4. Ferubko E. V., Trumpe T. E., Kurmanova E. N., Kolkhir V. K., Sidel'nikova G. F., Gromakova A. I. Human use of FGBNU VILARS phytopreparations. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2016;6(19):11–15. (In Russ.)
5. Enkhtaivan G., John K. M. M., Pandurangan M., Hur J. H., Leutou A. S., Kim D. H. Extreme effects of Seabuckthorn extracts on influenza viruses and human cancer cells and correlation between flavonol glycosides and biological activities of extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(7):1646–1656. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.01.004.
6. Kim S.-J., Hwang E., Yi S. S., Song K. D., Lee H.-K., Heo T.-H., Park S.-K., Jung Y. J., Jun H. S. Sea Buckthorn leaf extract inhibits glioma cell growth by reducing reactive oxygen species and promoting apoptosis. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2017;182(4):1663–1674. DOI: 10.1007/s12010-017-2425-4.
7. Kubczak M., Khassenova A. B., Skalski B., Michlewska S., Wielanek M., Sklodowska M., Aralbayeva A. N., Nabiyeva Z. S., Murzakhmetova M. K., Zamaraeva M., Bryszewska M., Ionov M. *Hippophae rhamnoides* L. leaf and twig extracts as rich sources of nutrients and bioactive compounds with antioxidant activity. *Scientific Reports*. 2022;12(1):1095. DOI: 10.1038/s41598-022-05104-2.

8. Kumar M. S. Y., Dutta R., Prasad D., Misra K. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant. *Food Chemistry*. 2011;127(3):1309–1316. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.088.
9. Ma X., Moilanen J., Laaksonen O., Yahg W., Tenhu E., Yang B. Phenolic compounds and antioxidant activities of tea-type infusion processed from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *Food Chemistry*. 2019;272:1–11. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.08.006.
10. Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Kazaki K. Casuariin, stachyurin and strictinin, new ellagitannins from Casuarina stricta and Stachyurus praecox. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1982;30(2):766–769. DOI: 10.1248/cpb.30.766.
11. Skalski B., Kontek B., Olas B., Zuchowski J., Stochmal A. Phenolic fraction and nonpolar fraction from sea buckthorn leaves and twigs: Chemical profile and biological activity. *Future Medicinal Chemistry*. 2018;10(20):2381–2394. DOI: 10.4155/fmc-2018-0144.
12. Suvanto J., Tähtinen P., Valkamaa S., Engström M. T., Karonen M., Salminen J.-P. Variability in Foliar ellagitannins of Hippophae rhamnoides L. and identification of a new ellagitannin, Hippophaenin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(3):613–620. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04834.
13. Yoshida T., Hatano T., Ito H., Okuda T. Chemical and biological perspectives of ellagitannin oligomers from medicinal plants. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2000;23:395–453. DOI: 10.1016/S1572-5995(00)80134-9.
14. Yoshida T., Tanaka K., Chen X.-M., Okuda T. Tannins from *Hippophae rhamnoides*. *Phytochemistry*. 1991;30(2):663–666. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83748-A.
15. Aytuarova A. Sh., Zhusupova G. E. Qualitative and quantitative assessment of the composition of biologically active substances of the aboveground part of the plant species *Hippophaë rhamnoides* L. *Bulletin of the Scientific and Technical Society «KAKHAK»*. 2015;4(51):4–10. (In Russ.)
16. Tarasov A. V., Bukharinova M. A., Khamzina E. I. Aqueous Extracts Antioxidant Activity Determination of Some Plants from the Ural Region. *Food Chemistry and Hygiene*. 2018;3(2):31–38. (In Russ.) DOI: 10.29141/2500-1922-2018-3-2-5.
17. Murzakhmetova M. K., Utegalieva R. S., Aralbaeva A. N., Lesova Z. T. Study of antioxidant and membrane-protective properties of sea buckthorn extracts. *Actualscience*. 2015;1(5(5)):26–28. (In Russ.)
18. Karomatov I. D., Bukaev M. K. Sea buckthorn as an adaptogenic medicinal plant that increases physical strength. *Biology and Integrative Medicine*. 2018;6(23):37–47. (In Russ.)
19. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S. C., Sharma M., Singh S., Kumar H. T., Singh A. K., Nivsarkar M., Kaushik M. P., Sawhney R. C., Chaurasia O. P., Prasad G. B. K. S. Protective effect of ethanolic and water extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(10):821–831.
20. Usha T., Middha S. K., Goyal A. K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. Molecular docking studies of anti-cancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research*. 2014;28(5):406–415. DOI: 10.7555/JBR.28.20130110.
21. Saggu S., Divekar H. M., Gupta V., Sawhney R. C., Banerjee P. K., Kumar R. Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45(4):609–617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
22. Bogomolova N. I., Lupin M. V. Biological potential of sea buckthorn productivity in natural and industrial stands of Russia. *Bulletin of Agrarian Science*. 2021;6(93):62–67. (In Russ.) DOI: 10.17238/issn2587-666X.2021.6.62.
23. Novruzov E. N., Mamedov Z. G., Mustafaeva L. A., Miryusifova Kh. M., Zeynalova A. M. Composition and content of flavonoids of leaves of *Hippophae rhamnoides* L., relating in Azerbaijan. *Chemistry of plant raw materials*. 2018;3:209–214. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2018033772.
24. Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Buzlama A. V., Kuznetsov A. Yu. Pharmacological activity of sea buckthorn leaves: *in silico* and *in vivo*. *Drug development & registration*. 2023;12(3):174-188. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-174-188.
25. Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Chuvikova I. V., Slivkin A. I. Development and Validation of a Procedure for Quantitative Determination of Flavonoids in Sea Buckthorn Leaves by Spectrophotometry. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):216–226. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-531.
26. Kabanov D. S. Qualitative composition and antitumor effect of polyphenolic compounds from *Hippophae rhamnoides* L. leaves using different extractants (mini-review). In: Collection of materials of the International Conference "Achievements and prospects for creating new herbal medicines". 2024. P. 408–413. (In Russ.)
27. Kabanov D. S., Rubtsova T. A., Baleev D. N. Effect of hydrolyzable tannins from *Hippophae rhamnoides* L. leaves on the metabolic activity of human keratinocytes (HaCaT). In: Collection of scientific papers of the International scientific and practical conference "Achievements and prospects for creating new herbal medicines". 2023. P. 349–357. (In Russ.)
28. Trineeva O. V., Kovaleva N. A., Safonova E. F., Slivkin A. I. Application of TLC for the assessment of the flavonoid profile of sea buckthorn leaves during different phases of their preparation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023;23(4):547–557. (In Russ.) DOI: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11564.
29. Geyss F. Fundamentals of thin-layer chromatography. Moscow: Mir; 1999. 405 p. (In Russ.)
30. Rudakov O. B., Vostrov I. A., Fedorov S. V., Filippov A. A., Selemenev V. F., Pridantsev A. A. Chromatographer's Companion. Liquid Chromatography Methods. Voronezh: Vodoley; 2004. 528 p. (In Russ.)

Оригинальная статья / Research article

УДК 543.865/.867

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2239

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и валидационная оценка методики спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в плодах и эфирном масле фенхеля обыкновенного

Р. Ш. Хазиев[1], С. Д. Рюмин[1]✉, Г. Р. Рамаева[1], А. В. Немтарев[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России). 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (КФУ). 420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

✉ **Контактное лицо:** Рюмин Сергей Денисович. **E-mail:** ryumin-2000@list.ru

ORCID: Р. Ш. Хазиев – https://orcid.org/0009-0007-7200-6929;
С. Д. Рюмин – https://orcid.org/0009-0000-6226-291X;
Г. Р. Рамаева – https://orcid.org/0009-0009-4687-4153;
А. В. Немтарев – https://orcid.org/0000-0001-8478-2705.

Статья поступила: 27.11.2025 **Статья принята в печать:** 10.02.2026 **Статья опубликована:** 13.02.2026

Резюме

Введение. Плоды фенхеля обладают выраженной ветрогонной и спазмолитической активностью благодаря особенности состава эфирного масла, доминирующим компонентом которого является фенилпропаноид – *транс*-анетол. Его содержание в эфирном масле может варьироваться в широком диапазоне. При этом в Российской фармакопее XV издания стандартизация по содержанию анетола для плодов фенхеля не предусмотрена.

Цель. Разработка и валидационная оценка спектрофотометрической методики определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного.

Материал и методы. В качестве объекта исследования использовались плоды фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.) производства ООО Фирма «Здоровье» 2024 года. В работе использовали спектрофотометр UNICO-2802 (Россия), весы аналитические АДВ-200М (Россия), газовый хроматограф GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Япония), совмещенный с масс-селективным детектором. При спектрофотометрическом определении навески эфирного масла и стандартного образца анетола растворяли в 95%-м спирте и снимали оптические плотности растворов при длине волны 259 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Результаты спектрофотометрической методики подтверждали с помощью газовой хроматографии.

Результаты и обсуждение. Валидация представленной методики, проведенная в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи XV издания, показала ее специфичность, линейность, прецизионность и правильность. Результаты не отягощены систематической погрешностью. Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 2,0 %. Результаты спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол (46,5 ± 0,7 %) коррелируют с результатами ГЖХ-анализа (48,6 ± 1,1 %).

Заключение. Разработанная методика количественного определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол может быть использована для стандартизации как самих плодов фенхеля обыкновенного путем введения дополнительного критерия оценки качества его эфирного масла в раздел «Количественное определение», так и эфирного масла фенхеля, используемого в качестве субстанции для изготовления лекарственных препаратов.

Ключевые слова: анетол, фенхель обыкновенный (*Foeniculum vulgare* Mill.), валидация, количественное определение, спектрофотометрия, ГЖХ

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

© Хазиев Р. Ш., Рюмин С. Д., Рамаева Г. Р., Немтарев А. В., 2026
© Khaziev R. Sh., Ryumin S. D., Ramaeva G. R., Nemtarev A. V., 2026

Вклад авторов. Р. Ш. Хазиев – идея, окончательное редактирование рукописи, интерпретация результатов. С. Д. Рюмин – проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка черновика рукописи, анализ литературы, написание и подготовка рукописи для публикации. Г. Р. Рамаева – проведение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных. А. В. Немтарев – проведение эксперимента (газохроматографический анализ), анализ и интерпретация полученных данных, редактирование рукописи.

Для цитирования: Хазиев Р. Ш., Рюмин С. Д., Рамаева Г. Р., Немтарев А. В. Разработка и валидационная оценка методики спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в плодах и эфирном масле фенхеля обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):182–191. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2239

Development and validation evaluation of a technique for the spectrophotometric determination of the amount of aromatic compounds in fruits and essential oil of fennel

Ramil' Sh. Khaziev[1], Sergey D. Ryumin[1]✉, Gel'fiya R. Ramaeva[1], Andrey V. Nemtarev[2]

[1] Kazan State Medical University (KSMU). 49, Butlerova str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420012, Russia
[2] Kazan (Volga region) Federal University (KFU). 18, Kremlevskaya str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420008, Russia

✉ **Corresponding author:** Sergey D. Ryumin. **E-mail:** ryumin-2000@list.ru

ORCID: Ramil' Sh. Khaziev – https://orcid.org/0009-0007-7200-6929;
Sergey D. Ryumin – https://orcid.org/0009-0000-6226-291X;
Gel'fiya R. Ramaeva – https://orcid.org/0009-0009-4687-4153;
Andrey V. Nemtarev – https://orcid.org/0000-0001-8478-2705.

Received: 27.11.2025 **Accepted:** 10.02.2026 **Published:** 13.02.2026

Abstract

Introduction. Fennel fruits have pronounced carminative and antispasmodic activities due to the composition of the essential oil. The major component of the fennel fruits essential oil is phenylpropanoid *trans*-anethole. Its content in essential oil varies over a wide range. However, the Russian Pharmacopoeia XV does not provide for a standardization of anethole content for fennel fruits.

Aim. The aim is to develop and validate a spectrophotometric method for determining the amount of aromatic compounds in terms of anethole in the fennel fruits essential oil.

Material and methods. The fruits of common fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) produced by LLC Firma "Zdorovye" in 2024 were used as the object of the study. A UNICO-2802 spectrophotometer (Russia), ADV-200M analytical scales (Russia), GCMS-QP2010 Ultra gas chromatograph (Shimadzu, Japan) combined with a mass-selective detector were used in the work. An essential oil and a standard anethole samples were dissolved in 95 % ethanol during the spectrophotometric determination. The optical densities of the test solutions at 259 nm were determined in cuvettes with a layer thickness of 10 mm. The results of the spectrophotometric method were confirmed by gas chromatography.

Results and discussion. Validation of the presented method in accordance with the requirements of OFC.1.1.0012 "Validation of analytical methods" of the State Pharmacopeia XV edition was carried out. Its specificity, linearity, precision and correctness were showed. Results are not subject to systematic error. The relative standard deviation (RSD) does not exceed 2.0 %. The results of spectrophotometric determination of the amount of aromatic compounds in terms of anethole (46.5 ± 0.7 %) correlate with the results of GC analysis (48.6 ± 1.1 %).

Conclusion. The developed method for quantifying the amount of aromatic compounds in terms of anethole can be used to standardize both the fennel fruits themselves and the essential oil obtained from them.

Keywords: anethole, fennel vulgare (*Foeniculum vulgare* Mill.), validation, quantification, spectrophotometry, GC

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

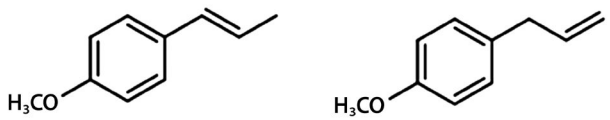
Contribution of the authors. Ramil' Sh. Khaziev – idea, final editing of the manuscript, interpretation of the results. Sergey D. Ryumin – conducting an experiment, analysis and interpretation of the data obtained, preparation of a draft manuscript, literature analysis, writing and preparation of the manuscript for publication. Gel'fiya R. Ramaeva – conducting an experiment, analysis and interpretation of the data obtained. Andrey V. Nemtarev – conducting an experiment (gas chromatographic analysis), analysis and interpretation of the data obtained, editing of the manuscript.

For citation: Khaziev R. Sh., Ryumin S. D., Ramaeva G. R., Nemtarev A. V. Development and validation evaluation of a technique for the spectrophotometric determination of the amount of aromatic compounds in fruits and essential oil of fennel. *Drug development & registration*. 2026;15(1):182–191. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2239

ВВЕДЕНИЕ

Фенхель обыкновенный (*Foeniculum vulgare* Mill.) – травянистое эфиромасличное растения семейства сельдерейных (*Apiaceae*). Фенхель находит широкое применение в медицинской практике для лечения функциональных нарушений ЖКТ, в том числе детских колик, благодаря выраженной ветрогонной и спазмолитической активности, а также для лечения заболеваний верхних дыхательных путей у детей как отхаркивающее средство [1–3].

Такая фармакологическая активность обусловлена особенностью состава эфирного масла плодов фенхеля, доминирующим компонентом которого является фенилпропаноид – *транс*-анетол (рисунок 1) [4].



Анетол
Anethole

Эстрагол
Estragole

Рисунок 1. Химическая структура анетола и эстрагола

Figure 1. Chemical structure of anethole and estragole

Однако в ряде публикаций было показано, что содержание анетола в эфирном масле плодов фенхеля в зависимости от сорта может варьироваться в широком диапазоне. Помимо сортовой принадлежности, ключевую роль в накоплении анетола также играют такие факторы, как место и климатические условия произрастания растений, вегетативная фаза сбора плодов. При этом, помимо анетола, в эфирном масле плодов фенхеля может накапливаться имеющий схожее строение с анетолом фенилпропаноид – эстрагол. Эстрагол по отношению к анетолу в плодах фенхеля может накапливаться как в небольших количествах, так и в приблизительно равных, а может и значительно его превышать [5–9]. В экспериментах на животных было показано, что эстрагол проявляет канцерогенную и мутагенную активность [10], и содержание его в растительных объектах должно регламентироваться.

Плоды фенхеля включены в Европейскую фармакопею 11-го издания. В зависимости от количественного содержания анетола в эфирном масле Европейская фармакопея выделяет в отдельные статьи два подвида фенхеля: горький и сладкий. Так, для сладкого подвида установлено предельное содержание анетола в эфирном масле – не менее 80 %, а для горького – не менее 60 %. Для обоих подвидов стандартизация ведется по содержанию эфирного масла с дополнительным определением основных компонентов методом газовой хроматографии. Помимо этого, Европейская фармакопея отдельно предлагает стандартизацию эфирного масла фенхеля горького методом газовой хроматографии[1].

В то же время Российская фармакопея XV издания не разделяет плоды фенхеля на подвиды и предлагает проводить стандартизацию плодов фенхеля только по содержанию эфирного масла с обнаружением основных групп биологически активных веществ (анетола и фенхона) методами тонкослойной и газовой хроматографии без их количественного определения[2] [11–13], что, по нашему мнению, является не совсем корректным, так как в зависимости от сорта содержание анетола в эфирном масле фенхеля может широко варьироваться. На сайте Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» был опубликован проект фармакопейной статьи «Фенхеля обыкновенного плоды горькие» для включения в Российскую фармакопею, в котором предлагается дополнительно определять в эфирном масле содержание анетола (не менее 60 %), фенхона (не менее 15 %) и эстрагола (не более 5 %) методом газовой хроматографии[3].

С учетом вышеизложенного представляется актуальным дополнить стандартизацию плодов фенхеля обыкновенного по содержанию анетола.

За счет ароматической структуры анетол способен поглощать ультрафиолетовый свет в диапазоне длин волн от 250 до 260 нм, где максимум поглощения приходится на 259 нм (рисунок 2). Это дает возможность использовать спектрофотометрический метод определения суммы ароматических компонентов в эфирном масле фенхеля обыкновенного, основываясь на измерении оптической плотности спиртового раствора эфирного масла. Между тем в ряде случаев высокое содержание эстрагола в эфирном масле в теории могло бы мешать определению анетола спектрофотометрическим методом из-за его ароматической структуры и способности поглощать УФ-свет в том же диапазоне, что и анетол. Нами был зарегистрирован УФ-спектр спиртового раствора эстрагола (28,1 мкг/мл), где максимум поглощения приходился на 277 нм (рисунок 2).

В дополнение к этому эстрагол имеет низкое значение удельного показателя поглощения, при разведении раствора эстрагола в 10 раз, как это делается для анетола, его оптическая плотность значительно падает. На рисунке 3 представлены спектры спиртовых растворов анетола и эстрагола в концентрации 2,81 мкг/мл.

[1] European Pharmacopeia. 11.8 edition. Strasbourg: EDQM; 2015. Available at: https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia. Accessed: 10.09.2025.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ Ссылка активна на 10.09.2025.

[3] Проект фармакопейной статьи «Фенхеля обыкновенного плоды горькие». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-15/fenkhelya-obyknovennogo-plody-gorkie/?vers=8061&projects=Y&comments=y. Ссылка активна на 10.09.2025.

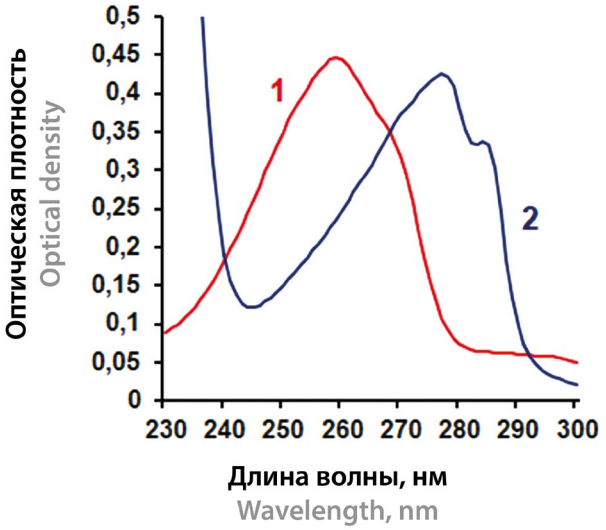


Рисунок 2. УФ-спектр спиртовых растворов анетола (2,81 мкг/мл) (1) и эстрагола (28,1 мкг/мл) (2)

Figure 2. UV spectrum of alcohol solution of anethole (2.81 mcg/ml) (1) and estragole (28.1 mcg/ml) (2)

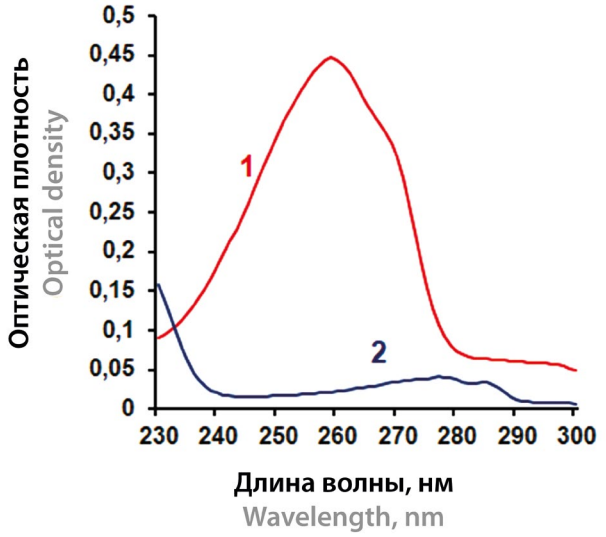


Рисунок 3. УФ-спектр спиртовых растворов анетола (1), эстрагола (2) в концентрации 2,81 мкг/мл

Figure 3. UV spectrum of alcohol solutions of anethole (1), estragole (2) in the concentration 2.81 mcg/ml

Бициклический монотерпен фенхон (до 25 %) не поглощает ультрафиолетовый свет в указанной области, а анисовый альдегид (до 2 %) вносит несущественный вклад в оптическую плотность спиртового раствора эфирного масла фенхеля обыкновенного. Таким образом, данный метод позволяет определять преимущественно содержание анетола.

Мы предлагаем спектрофотометрическую методику определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного.

Результаты спектрофотометрических определений подтверждали методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии.

Целью данной работы является разработка и валидационная оценка спектрофотометрической методики определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали спектрофотометр UNICO-2802 (Россия), весы аналитические АДВ-200М (Россия), субстанцию *транс*-анетола с содержанием основного вещества 99,0 % (Acros Organics, Бельгия), плоды фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* L.) производства ООО Фирма «Здоровье», серия 010724, срок годности до 07.2027. Субстанцию анетола использовали для приготовления стандартных растворов и в методе добавок.

Методика получения эфирного масла из фенхеля обыкновенного: эфирное масло получали из 15 г сырья перегонкой с водой в течение 2 часов по методу 1 Государственной фармакопеи РФ[1].

Методика приготовления раствора эфирного масла: 0,03 г (точная навеска) эфирного масла плодов фенхеля обыкновенного помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 95%-м этиловом спирте и доводили до метки тем же растворителем (раствор A). 0,1 мл раствора A переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор B). 5 мл раствора B переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор C).

Методика приготовления раствора анетола: 0,035 г (точная навеска) анетола помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 95%-м этиловом спирте и доводили до метки тем же растворителем (раствор D). 0,1 мл раствора D переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор E). 2,0 мл раствора E переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор F).

Методика приготовления 7 растворов анетола для построения линейности: 0,035 г (точная навеска) анетола помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 95%-м этиловом спирте и доводили до метки тем же растворителем (раствор D).

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ Ссылка активна на 10.09.2025.

0,1 мл раствора D переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор E). В 7 мерных колб вместимостью 10 мл вносили аликвоты по 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; 2,4; 2,6 мл раствора E и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (растворы F).

Оптическую плотность растворов C и F измеряли при длине волны 259 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 96%-й этиловый спирт.

Содержание суммы ароматических соединений в эфирном масле (мг/г) в пересчете на анетол рассчитывали по формуле:

$$m_{нд} = \frac{A_x \cdot a_{ст.} \cdot b_x \cdot P \cdot 1000}{A_{ст.} \cdot a_x \cdot b_{ст.} \cdot 100},$$

где A_x и $A_{ст.}$ – оптическая плотность исследуемого и стандартного растворов соответственно; $a_{ст.}$ – навеска анетола для приготовления стандартного раствора, г; a_x – навеска эфирного масла для приготовления раствора, г; b_x – разведение эфирного масла; $b_{ст.}$ – разведение анетола, где $b = \frac{V_{колбы}}{V_{пипетки}}$; P – чистота анетола.

Открываемость (%) рассчитывали из отношения «найдено – введено» по формуле:

$$R = \frac{m_{нд} \cdot 100}{m_{вв}},$$

где $m_{вв}$ – содержание суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного, мкг.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»[1], используя программу Microsoft Excel.

Тандемный анализ газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) проводили с помощью газового хроматографа GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Япония), совмещенного с масс-селективным детектором, при следующих условиях: капиллярная колонка BP-1 (длина 60 м, диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,5 мкм) с запрограммированной температурой термостата от 70 °C в течение 2 мин, которая затем повышалась до 200 °C со скоростью 10 °C/мин, выдерживалась при конечной температуре 15 мин. Общее время работы – 30 мин. Давление – 355,7 кПа; температура инжектора – 200 °C; режим введения – 0,2 с с делением потока 1:50, объем образца – 1 мкл; температура детектора – 220 °C; газ-носитель – гелий. Условия МС: температура ионного источника – 210 °C; электронный удар – 70 эВ; режим сбора данных – сканирование (m/z 45–500). Пики на хроматограммах идентифицировали на основе поиска в химической библиотеке с использованием программы GCMSsolution real time analysis, а также путем сравнения экспериментальных и литературных значений индексов Ковача.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидационную оценку методики количественного определения содержания анетола в эфирном масле фенхеля проводили по показателям: специфичности, линейности и аналитической области методики, прецизионности и правильности – в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик»[2].

Специфичность методики определяли, снимая спектры поглощения электромагнитного излучения спиртовых растворов анетола в концентрации 2,2 мкг/мл и спиртового раствора эфирного масла, полученного из плодов фенхеля обыкновенного, с содержанием анетола 2,8 мкг/мл (рисунок 4). Спектры стандартного образца анетола и эфирного масла, полученного из плодов фенхеля обыкновенного, представлены на рисунке 4. Как видно из рисунка 4, максимум поглощения анетола и эфирного масла наблюдается при длине волны 259 нм. Таким образом, предлагаемая методика количественного определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного валидна по показателю «специфичность» (рисунок 4).

Линейность и аналитическую область методики устанавливали путем статистической обработки выборки, полученной в результате количественного определения 7 модельных проб (растворы E) на 7 уровнях концентрации в диапазоне 70–130 % от количества анетола, принятого за 100 % (2,81 мкг в 1 мл раствора) (таблица 1). Определение проводили в трех повторностях. На основании полученных данных строили график в координатах «оптическая плотность – концентрация анетола, мкг/мл». Исследование зависимости показало, что она имеет линейный характер и описывается уравнением: $y = ax + b$, где $a = 0{,}1494$, $b = 0{,}0103$ (рисунок 5). Рассчитанное значение коэффициента линейной корреляции r составляет 0,9994, что отвечает условию $|r| \geq 0{,}99$ и позволяет сделать заключение о валидности по показателям «линейность» и «аналитическая область методики».

[1] ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-13/1/1-1/1-1-13/ Ссылка активна на 10.09.2025.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ Ссылка активна на 10.09.2025.

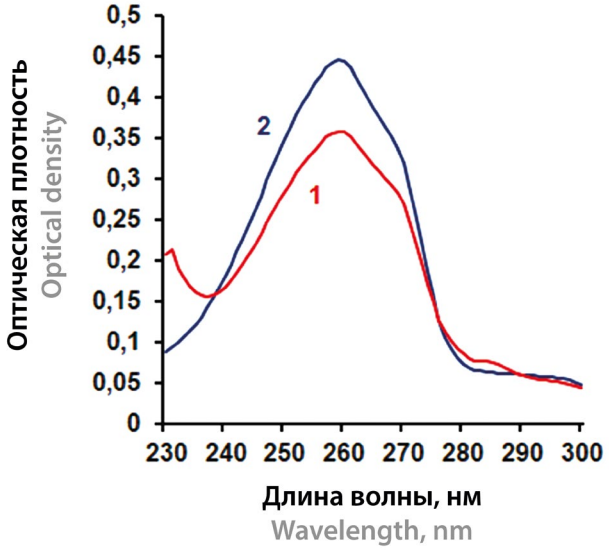


Рисунок 4. **УФ-спектр спиртовых растворов анетола (1), эфирного масла из плодов фенхеля обыкновенного (2)**

Figure 4. **UV spectrum of alcohol solutions of anethole (1), essential oil from the fruits of fennel (2)**

Прецизионность предложенной методики оценивали по повторяемости (сходимости) на 9 пробах (таблица 2), измеряя оптическую плотность растворов С. Однородность выборки проверяли с помощью Q-критерия по ОФС.1.1.0013. Рассчитанные значения Q_i меньше табличного $Q_{табл.} = 0{,}46$ ($n = 9$, $P = 95\,\%$), то есть полученные результаты не отягощены грубой ошибкой. Относительное стандартное отклонение не превышает 2,0 %, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Правильность предложенной методики проверяли методом добавок. Для этого к аликвоте раствора эфирного масла с содержанием анетола 2,14 мкг/мл, принятого за 100 %, добавляли точно известное количество анетола в количестве 25 % (0,53 мкг/мл), 50 % (1,07 мкг/мл) и 75 % (1,60 мкг/мл) (таблица 3). Определение проводили в трех повторностях для каждой концентрации. Как видно из таблицы 3, рассчитанные и найденные значения анетола в эфирном масле с добавками анетола близки, открываемость составила 100,08 %, что позволяет считать предлагаемую методику валидной по показателю «правильность». Относительное стандартное отклонение не превышает 2 %, относительная ошибка среднего – 1 %.

Таблица 1. **Оценка линейности аналитической методики**

Table 1. **Evaluation of the linearity of the analytical methodology**

Аликвота, мл Aliquot, ml	**Концентрация анетола, мкг/мл** Anethole concentration, mcg/ml	**Оптическая плотность** Optical density
1,4	1,97	0,301
1,6	2,25	0,349
1,8	2,53	0,390
2,0	2,81	0,431
2,2	3,09	0,472
2,4	3,37	0,512
2,6	3,65	0,555
Параметры линейной зависимости $y = 0{,}1494x + 0{,}0103$, $r = 0{,}9994$ Linear dependence parameters $y = 0{,}1494x + 0{,}0103$, $r = 0{,}9994$		

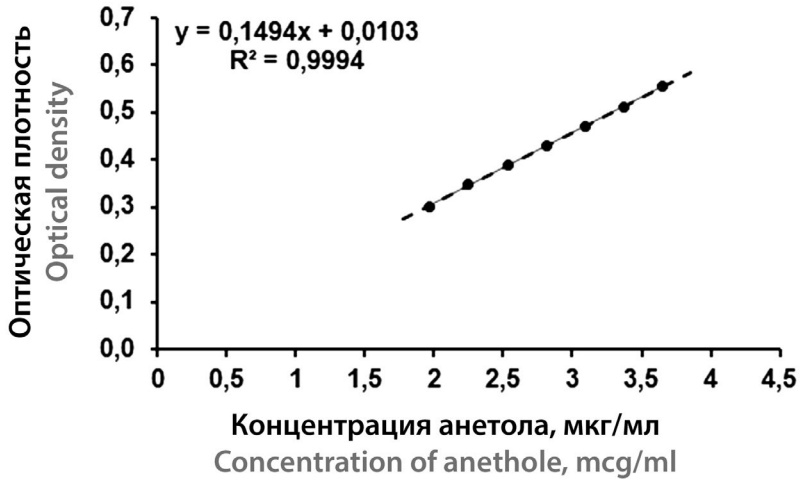


Рисунок 5. **График линейной зависимости оптической плотности анетола от его концентрации в измеряемом растворе**

Figure 5. **Graph of the linear dependence of the optical density of anethole on its concentration in the measured solution**

Таблица 2. Определение повторяемости (сходимости) методики количественного определения анетола в эфирном масле фенхеля обыкновенного ($n = 9$, $P = 95$ %)

Table 2. Determination of repeatability (convergence) of the method of quantitative determination of anethole in fennel essential oil ($n = 9$, $P = 95$ %)

Навеса масла, г Oil sample, g	Найденное значение суммы ароматических соединений, $m_{нд}$, мг/г Sums of aromatic compounds were found, m_{found}, mg/g	Метрологические характеристики Metrological characteristics
0,0240	445,8	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 464{,}6 \pm 6{,}9$ $s = 8{,}9964$ $s^2 = 80{,}935$ RSD = 1,9 % $\bar{\varepsilon} = 1{,}5$ %
0,0240	458,7	
0,0241	475,0	
0,0300	462,6	
0,0298	462,1	
0,0300	466,1	
0,0360	475,1	
0,0261	469,4	
0,0260	466,9	

В ходе ГЖХ-анализа в образцах эфирного масла плодов фенхеля обыкновенного было обнаружено 14 компонентов (таблица 4). На рисунке 6 представлена хроматограмма эфирного масла плодов фенхеля.

Как видно из таблицы, основными компонентами эфирного масла являются анетол (48,6 ± 1,1 %) и эстрагол (38,3 ± 1,2 %). Результаты спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол (46,5 ± 0,7 %) коррелируют с результатами ГЖХ-анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана спектрофотометрическая методика определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного.
2. Проведена валидационная оценка методики спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол в эфирном масле плодов фенхеля обыкновенного. Результаты эксперимента не отягощены систематической ошибкой и можно заключить, что предложенная методика валидна по показателям «специфичность», «линейность» и «аналитическая

Таблица 3. Содержание анетола в растворе эфирного масла фенхеля обыкновенного с добавками анетола ($n = 9$, $P = 95$ %)

Table 3. Anethole content in a solution of fennel essential oil with anethole additives ($n = 9$, $P = 95$ %)

Содержание анетола в образце, мкг/мл The anethole content in the sample is mcg/ml	Добавлено анетола, мкг/мл Added anethole mcg/ml	Рассчитанное значение суммы анетола в образце, мкг/мл The amount of anethole in the sample is calculated, mcg/ml	Найденное значение суммы анетола, мкг/мл The amount of anethole was found, mcg/ml	Открываемость, % Openness, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics
2,14	0,53	2,67	2,71	101,5	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 100{,}08$ $s = 1{,}028$ $s^2 = 1{,}057$ RSD = 1,0 % $\bar{\varepsilon} = 0{,}8$ %
			2,67	100,0	
			2,65	99,3	
2,14	1,07	3,21	3,25	101,3	
			3,25	101,3	
			3,19	99,4	
2,14	1,60	3,74	3,72	99,5	
			3,69	98,7	
			3,73	99,7	

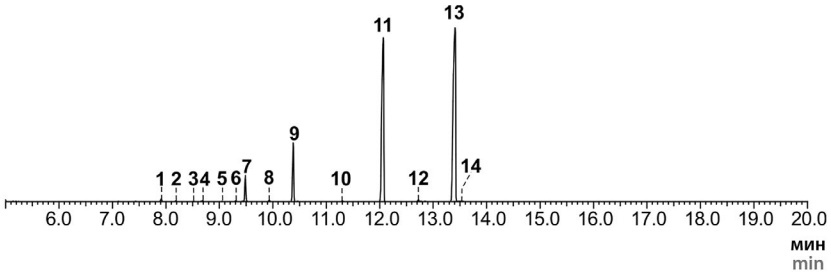


Рисунок 6. Хроматограмма (ГХ-МС) эфирного масла фенхеля

Figure 6. Chromatogram (GC-MS) of fennel essential oil

Таблица 4. Компонентный состав эфирного масла фенхеля по данным ГХ-МС

Table 4. Component composition of fennel essential oil according to GC-MS data

№	RT, мин[1] RT, min[1]	Название Name	KI_{exp}[2]	KI_{lit}[2]	С, масс%[3] C, mass%[3]	С, масс%[4] C, mass%[4]
1	7,911	α-пинен α-pinene	941	941[14]	0,37 ± 0,08	–
2	8,184	камфен camphene	957	957[14]	0,1 ± 0,03	–
3	8,507	β-пинен β-pinene	976	976[15]	0,04 ± 0,006	–
4	8,685	β-мирцен β-myrcene	985	986[16]	0,15 ± 0,008	–
5	9,054	α-феландрен α-phellandrene	1006	1009[14]	0,05 ± 0,009	–
6	9,307	*пара*-цимен *para*-cymene	1021	1025[14]	0,13 ± 0,01	–
7	9,485	лимонен limonene	1032	1035[14]	3,13 ± 0,09	–
8	9,933	γ-терпинен γ-terpinene	1058	1058[14]	0,18 ± 0,05	–
9	10,381	фенхон fenchone	1085	1086[17]	8,09 ± 0,8	–
10	11,301	камфора camphor	1141	1141[18]	0,1 ± 0,05	–
11	12,066	эстрагол estragole	1189	1185[19]	37,9 ± 0,9	38,3 ± 1,2
12	12,723	анисовый альдегид anisaldehyde	1232	1229[20]	0,21 ± 0,06	0,18 ± 0,08
13	13,409	анетол anethole	1278	1270[20]	49,4 ± 0,9	48,6 ± 1,1
14	13,537	α-терпинеол α-terpineol	1287	1289[21]	0,05 ± 0,02	–

Примечание. [1] RT – время удерживания (Retention time).

[2] KIexp и KIlit – экспериментальные и литературные значения индекса Ковача (Kovats index).

[3] Значения массовых концентраций рассчитаны по данным ГХ-МС по полному ионному току (метод внутренней нормализации).

[4] Значения массовых концентраций определены по данным ГХ-МС по калибровочной зависимости для стандартных образцов (метод абсолютной калибровки).

Note. [1] RT – Retention time.

[2] KIexp and KIlit – experimental and literature values of the Kovats index.

[3] Mass concentration values according to GC-MS data (internal normalization method).

[4] Mass concentration values according to GC-MS data (absolute calibration method).

область методики», «прецизионность» и «правильность».

3. Результаты спектрофотометрического определения суммы ароматических соединений в пересчете на анетол (46,5 ± 0,7 %) коррелируют с результатами ГЖХ-анализа (48,6 ± 1,1 %).

ЛИТЕРАТУРА

1. Буракба С., Марахова А. И., Станишевский Я. М., Василенко И. А., Жилкина В. Ю. Изучение потенциала фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.) как ценного лекарственного растения (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):59-67. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1617.
2. Annahazi A., Kuch B., Ridzal L., Mansouri N., Hosni I., Schemann M. Fennel Tea Has a Region-Specific Effect on the Motility of the Stomach. *Neurogastroenterology & Motility*. 2025;37(12):e70201. DOI: 10.1111/nmo.70201.
3. Budriesi R., Corazza I., Roncioni S., Scanferlato R., De Luca D., Marzetti C., Gotti R., Rizzardi N., Bergamini C., Micucci M., Roncarati D., Mattioli L. B. Herbal Extracts Mixed with Essential Oils: A Network Approach for Gastric and Intestinal Motility Disorders. *Nutrients*. 2024;16(24):4357. DOI: 10.3390/nu16244357.
4. Золотилова Е. В., Золотилова О. М. Изучение компонентного состава эфирного масла *Foeniculum vulgare* Mill. выращенного в Предгорье Крыма. В сб.: Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования но-

вых лекарственных средств. Сборник трудов 9-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2023». Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете. 28–29 сентября 2023. Воронеж: Воронежский государственный университет; 2023. С. 257–262. DOI: 10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-257-262.

5. Kalleli F., Bettaieb Rebey I., Wannes W. A., Boughalleb F., Hammami M., Saidani Tounsi M., M'hamdi M. Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *Journal of Food Biochemistry*. 2019;43(8):e12935. DOI: 10.1111/jfbc.12935.
6. Wal A., Gupta D., Gasmi A., Khan A., Ashesh A. M., Kumar A., Kumar D. Unveiling the chemical composition, bioactive properties, and potential applications of fennel essential oil. *South African Journal of Botany*. 2025;185:617–630. DOI: 10.1016/j.sajb.2025.08.020.
7. Saxena S. N., Kakani R. K., Rator S. S., Meena, R. S., Vishal M. K., Sharma L. K., Agrawal D., John S., Panwar A., Singh B. Genetic Variation in Essential Oil Constituents of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Germplasm. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016;19(4):989–999. DOI: 10.1080/0972060X.2016.1191378.
8. Ahmed A. F., Shi M., Liu C., Kang W. Comparative analysis of antioxidant activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Egypt and China. *Food Science and Human Wellness*. 2019;8(1):67–72. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.03.004.
9. Abdellaoui M., Bouhlali E. D. T., Derouich M., El-Rhaffari L. Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *South African Journal of Botany*. 2020;135:93–100. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.09.004.
10. Булаев В. М., Ших Е. В., Сычев А. А. Безопасность и эффективность лекарственных растений. М.: Практическая медицина; 2013. 30 с.
11. Шефер Е. П., Антонова Н. П., Моргунов И. М., Прохватилова С. С., Зотова М. С. Способ определения компонентов эфирных масел в плодах аниса и фенхеля методом тонкослойной хроматографии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):419–425. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-545.
12. Самылина И. А., Баева В. М., Кузнецов Р. М. Совершенствование требований к качеству лекарственного растительного сырья плоды тмина, фенхеля и аниса обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(3):134–143.
13. Рязанова Т. К., Куркин В. А. Актуальные вопросы стандартизации лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения, содержащих эфирные масла. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2):146–153. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-495.
14. Chung T. Y., Eiserich J. P., Shibamoto T. Volatile Compounds Identified in Headspace Samples of Peanut Oil Heated under Temperatures Ranging from 50 to 200. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993;41(10):1693–1697. DOI: 10.1021/jf00034a033.
15. Rao B. R. R. Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f. *piperascens* Malinv. ex Holmes). *Industrial Crops and Products*. 2002;16(2):133–144. DOI: 10.1016/S0926-6690(02)00038-9.
16. Chisholm M. G., Wilson M. A., Gaskey G. M. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal*. 2003;18(2):106–115. DOI: 10.1002/ffj.1172.
17. Stashenko E. E., Cervantes M., Combariza Y., Fuentes H., Martínez J. R. HRGC/FID and HRGC/MSD Analysis of the Secondary Metabolites Obtained by Different Extraction Methods from Lepechinia schiedeana, and in Vitro Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1999;22(6):343–349. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4168(19990601)22:6<343::AID-JHRC343>3.0.CO;2-J.
18. Shatar S. Essential oil of Ferula ferulaoides from western Mongolia. *Chemistry of Natural Compounds*. 2005;41(5):607–608. DOI: 10.1007/s10600-005-0222-8.
19. Mallavarapu G. R., Rajeswara Rao B. R., Kaul P. N., Ramesh S., Bhattacharya A. K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and the herb of palmarosa (Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats. var. motia Burk.). *Flavour and Fragrance Journal*. 1998;13(3):167–169. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199805/06)13:3<167::AID-FFJ719>3.0.CO;2-B.
20. Stashenko E. E., Martinez C. R., Martinez J. R., Shibamoto T. Catalytic Transformation of Anise (*Pimpinella alzisum* L.) Oil over Zeolite Y. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1995;18(8):501–503. DOI: 10.1002/jhrc.1240180810.
21. Adedeji J., Hartman T. G., Rosen R. T., Ho C. T. Free and Glycosidically Bound Aroma Compounds in Hog Plum (*Spondias mombins* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991;39(8):1494–1497. DOI: 10.1021/jf00008a025.

REFERENCES

1. Bourakba S., Marakhova A. I., Stanishevskiy Ya. M., Vasilenko I. A., Zhilkina V. Y. Exploring the potential of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) as a valuable medicinal plant: a comprehensive (review). *Drug development & registration*. 2024;13(2):59–67. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1617.
2. Annahazi A., Kuch B., Ridzal L., Mansouri N., Hosni I., Schemann M. Fennel Tea Has a Region-Specific Effect on the Motility of the Stomach. *Neurogastroenterology & Motility*. 2025;37(12):e70201. DOI: 10.1111/nmo.70201.
3. Budriesi R., Corazza I., Roncioni S., Scanferlato R., De Luca D., Marzetti C., Gotti R., Rizzardi N., Bergamini C., Micucci M., Roncarati D., Mattioli L. B. Herbal Extracts Mixed with Essential Oils: A Network Approach for Gastric and Intestinal Motility Disorders. *Nutrients*. 2024;16(24):4357. DOI: 10.3390/nu16244357.
4. Zolotylova E. V., Zolototilova O. M. Study of the component composition of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil. grown in the Foothills of Crimea. In: Ways and forms of improving pharmaceutical education. Current issues of development and research of new medicines. Proceedings of the 9th International Scientific and Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2023". Dedicated to the 25th anniversary of the establishment of the Facul-

ty of Pharmacy at Voronezh State University. September 28–29, 2023. Voronezh: Voronezh State University; 2023. P. 257– 262. (In Russ.)

5. Kalleli F., Bettaieb Rebey I., Wannes W. A., Boughalleb F., Hammami M., Saidani Tounsi M., M'hamdi M. Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *Journal of Food Biochemistry*. 2019;43(8):e12935. DOI: 10.1111/jfbc.12935.
6. Wal A., Gupta D., Gasmi A., Khan A., Ashesh A. M., Kumar A., Kumar D. Unveiling the chemical composition, bioactive properties, and potential applications of fennel essential oil. *South African Journal of Botany*. 2025;185:617–630. DOI: 10.1016/j.sajb.2025.08.020.
7. Saxena S. N., Kakani R. K., Rator S. S., Meena, R. S., Vishal M. K., Sharma L. K., Agrawal D., John S., Panwar A., Singh B. Genetic Variation in Essential Oil Constituents of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Germplasm. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016;19(4):989–999. DOI: 10.1080/0972060X.2016.1191378.
8. Ahmed A. F., Shi M., Liu C., Kang W. Comparative analysis of antioxidant activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Egypt and China. *Food Science and Human Wellness*. 2019;8(1):67–72. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.03.004.
9. Abdellaoui M., Bouhlali E. D. T., Derouich M., El-Rhaffari L. Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *South African Journal of Botany*. 2020;135:93–100. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.09.004.
10. Bulaev V. M., Shikh E. V., Sychev A. A. Safety and effectiveness of medicinal plants. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2013. P. 30. (In Russ.)
11. Shefer E. P., Antonova N. P., Morgunov I. M., Prokhvatilova S. S., Zotova M. S. A Thin-Layer Chromatography Method for the Determination of Essential Oil Components in Anise and Fennel Fruits. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):419–425. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-545.
12. Samylina I. A., Baeva V. M., Kuznetsov R. M. Improvement of quality requirements for crude herbal drugs of fructus carvi, fructus foeniculi and fructus anisi vulgaris. *Drug development & registration*. 2017;(3):134–143. (In Russ.)
13. Ryazanova T. K., Kurkin V. A. Relevant Issues of Standardisation of Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations Containing Essential Oils. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):146–153. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-495.
14. Chung T. Y., Eiserich J. P., Shibamoto T. Volatile Compounds Identified in Headspace Samples of Peanut Oil Heated under Temperatures Ranging from 50 to 200. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993;41(10):1693–1697. DOI: 10.1021/jf00034a033.
15. Rao B. R. R. Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f. *piperascens* Malinv. ex Holmes). *Industrial Crops and Products*. 2002;16(2):133–144. DOI: 10.1016/S0926-6690(02)00038-9.
16. Chisholm M. G., Wilson M. A., Gaskey G. M. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal*. 2003;18(2):106–115. DOI: 10.1002/ffj.1172.
17. Stashenko E. E., Cervantes M., Combariza Y., Fuentes H., Martínez J. R. HRGC/FID and HRGC/MSD Analysis of the Secondary Metabolites Obtained by Different Extraction Methods from Lepechinia schiedeana, and in Vitro Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1999;22(6):343–349. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4168(19990601)22:6<343::AID-JHRC343>3.0.CO;2-J.
18. Shatar S. Essential oil of Ferula ferulaoides from western Mongolia. *Chemistry of Natural Compounds*. 2005;41(5):607–608. DOI: 10.1007/s10600-005-0222-8.
19. Mallavarapu G. R., Rajeswara Rao B. R., Kaul P. N., Ramesh S., Bhattacharya A. K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and the herb of palmarosa (Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats. var. motia Burk.). *Flavour and Fragrance Journal*. 1998;13(3):167–169. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199805/06)13:3<167::AID-FFJ719>3.0.CO;2-B.
20. Stashenko E. E., Martinez C. R., Martinez J. R., Shibamoto T. Catalytic Transformation of Anise (*Pimpinella alzisum* L.) Oil over Zeolite Y. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1995;18(8):501–503. DOI: 10.1002/jhrc.1240180810.
21. Adedeji J., Hartman T. G., Rosen R. T., Ho C. T. Free and Glycosidically Bound Aroma Compounds in Hog Plum (*Spondias mombins* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991;39(8):1494–1497. DOI: 10.1021/jf00008a025.

Оригинальная статья / Research article

УДК 577.2; 616-092

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2045

Check for updates

CC BY 4.0

Коррекция нарушений психоневрологического статуса, возникающих на фоне хронического токсического поражения головного мозга, блокаторами GPCR/cAMP- и JAC/STAT-сигнальных путей

Т. Ю. Полякова[1, 2]✉, Л. А. Мирошниченко[1], А. В. Чайковский[1], М. В. Белоусов[2], В. И. Агафонов[1, 2], Г. Н. Зюзьков[1]

[1] Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга. Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук. 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3.
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ **Контактное лицо:** Полякова Татьяна Юрьевна. **E-mail:** tasha93@mail.ru

ORCID: Т. Ю. Полякова – https://orcid.org/0000-0003-0971-7844;
Л. А. Мирошниченко – https://orcid.org/0000-0002-3684-5510;
А. В. Чайковский – https://orcid.org/0000-0003-4398-9122;
М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945;
В. И. Агафонов – https://orcid.org/0000-0001-9800-0487;
Г. Н. Зюзьков – https://orcid.org/0000-0003-0384-333X.

Статья поступила: 06.03.2024 **Статья принята в печать:** 10.12.2025 **Статья опубликована:** 12.12.2025

Резюме

Введение. Нарушения в функционировании ЦНС, возникающие при хроническом употреблении этанола, часто связаны с угнетением полноценного нейрогенеза. При этом одними из ведущих сигнальных каскадов, задействованных в регуляции пролиферации и дифференцировки нейральных и нейрональных стволовых клеток, считаются GPCR/cAMP-зависимый путь и JAK/STAT-сигналинг. Очевидно, что поиск принципиально новых подходов к терапии этаноловой нейродегенерации, путем воздействия на внутриклеточные сигнальные молекулы, весьма актуален и востребован для практической медицины.

Цель. Целью данного исследования явилось изучение влияния ингибиторов JAC/STAT и GPCR/cAMP на психоневрологический статус мышей, состояние стволовых клеток нервной ткани и секрецию нейротрофинов глией в условиях хронического токсического поражения головного мозга.

Материал и методы. Исследования проведены на 90 мышах линии C57BL/6. Алкогольную нейродегенерацию моделировали введением *per os* 30%-го раствора C_2H_5OH в дозе 3 г/кг/сут в течение 8 недель. Ингибиторы JAC/STAT и GPCR/cAMP вводили подкожно 1 раз в сутки в течение 7 дней в дозе 15 и 10 мкг/кг соответственно. Психофармакологические эффекты блокаторов оценивали в тесте «Открытое поле» и по степени сохранности условного рефлекса пассивного избегания. Культуральными методами изучали содержание нейральных стволовых клеток и коммитированных нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне головного мозга, их пролиферативную активность и интенсивность созревания, исследовали продукцию нейротрофных факторов клетками глии.

Результаты и обсуждение. Введение ингибиторов JAC/STAT и GPCR/cAMP корригировало функциональные признаки патологии мозга алкогольного генеза (наблюдалась отмена изменений ориентировочно-исследовательского поведения). При этом курсовое применение ингибитора GPCR/cAMP нивелировало, а введение блокатора JAC/STAT усугубляло снижение уровня воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания у алкоголизированных мышей. В группах животных, получавших ингибиторы JAC/STAT и GPCR/cAMP, отмечалось возрастание числа нейральных стволовых клеток и коммитированных нейрональных предшественников, сопровождающееся повышением их митотической активности и интенсивности специализации. Введение ингибитора GPCR/cAMP после моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга сопровождалось повышением секреции нейротрофинов астроцитами и микроглией.

Заключение. Полученные результаты указывают на перспективность разработки нового подхода к терапии хронического алкогольного поражения головного мозга путем таргетного воздействия на отдельные звенья системы внутриклеточной сигнальной трансдукции, в частности применение ингибиторов GPCR/cAMP.

© Полякова Т. Ю., Мирошниченко Л. А., Чайковский А. В., Белоусов М. В., Агафонов В. И., Зюзьков Г. Н., 2026
© Polyakova T. Yu., Miroshnichenko L. A., Chaikovskii A. V., Belousov M. V., Agafonov V. I., Zyuz'kov G. N., 2026

Ключевые слова: токсическое поражение головного мозга, этанол, ингибитор JAC/STAT, ингибитор GPCR/cAMP, нейротрофины, нейральные стволовые клетки, церебропротекторные средства

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

Вклад авторов. Т. Ю. Полякова, Л. А. Мирошниченко и А. В. Чайковский проработали литературные источники, провели экспериментальное исследование и статистическую обработку результатов, участвовали в написании текста статьи. М. В. Белоусов, В. И. Агафонов участвовали в написании и утверждении текста статьи. Г. Н. Зюзьков разработал дизайн эксперимента, провел окончательную корректировку статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по теме FGWM-2022-0018.

Для цитирования: Полякова Т. Ю., Мирошниченко Л. А., Чайковский А. В., Белоусов М. В., Агафонов В. И., Зюзьков Г. Н. Коррекция нарушений психоневрологического статуса, возникающих на фоне хронического токсического поражения головного мозга, блокаторами GPCR/cAMP- и JAC/STAT-сигнальных путей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):192–201. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2045

Correction of psychoneurological disorders arising against the background of chronic toxic brain damage with inhibitors of GPCR/cAMP and JAC/STAT signaling pathways

Tatiana Yu. Polyakova[1, 2]✉, Larisa A. Miroshnichenko[1], Alexander V. Chaikovskii[1], Mikhail V. Belousov[2], Vladimir I. Agafonov[1, 2], Gleb N. Zyuz'kov[1]

[1] Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM). Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. 3, prospekt Lenina, Tomsk, 634028, Russia
[2] Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatiana Yu. Polyakova. **E-mail:** tasha93@mail.ru

ORCID: Tatiana Yu. Polyakova – https://orcid.org/0000-0003-0971-7844;
Larisa A. Miroshnichenko – https://orcid.org/0000-0002-3684-5510;
Alexander V. Chaikovskii – https://orcid.org/0000-0003-4398-9122;
Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945;
Vladimir I. Agafonov – https://orcid.org/0000-0001-9800-0487;
Gleb N. Zyuz'kov – https://orcid.org/0000-0003-0384-333X.

Received: 06.03.2024 **Accepted:** 10.12.2025 **Published:** 12.12.2025

Abstract

Introduction. Impaired central nervous system function resulting from chronic ethanol consumption is often associated with suppressed neurogenesis. The GPCR/cAMP-dependent pathway and JAK/STAT signaling are considered to be among the key signaling cascades involved in regulating the proliferation and differentiation of neural and neuronal stem cells. Clearly, the search for fundamentally new approaches to treating ethanol-induced neurodegeneration by targeting intracellular signaling molecules is highly relevant and in demand in practical medicine.

Aim. The aim of this study was to investigate the effect of JAC/STAT and GPCR/cAMP inhibitors on the psychoneurological status of mice, the state of neural stem cells, and the secretion of neurotrophins by glia under conditions of chronic toxic brain injury.

Material and methods. The studies were conducted on 90 C57BL/6 mice. Alcohol-induced neurodegeneration was modeled by *per os* administration of 30 % C_2H_5OH solution at a dose of 3 g/kg/day for 8 weeks. JAC/STAT and GPCR/cAMP inhibitors were administered subcutaneously once a day for 7 days at a dose of 15 and 10 μg/kg, respectively. The psychopharmacological effects of the blockers were assessed in the open field test and by the degree of preservation of the conditioned passive avoidance reflex. The content of neural stem cells and committed neuronal precursors in the subventricular zone of the brain, their proliferative activity and maturation intensity were studied using cultural methods; the production of neurotrophic factors by glial cells was investigated.

Results and discussion. The introduction of JAC/STAT and GPCR/cAMP inhibitors corrected the functional signs of alcoholic brain pathology (changes in exploratory behavior were abolished). At the same time, the course use of a GPCR/cAMP inhibitor leveled out, and the introduction of a JAC/STAT blocker aggravated the decrease in the level of reproduction of the conditioned passive avoidance reflex in alcoholized mice. In the groups of animals receiving JAC/STAT and GPCR/cAMP inhibitors, an increase in the number of neural stem cells and committed neuronal precursors was observed, accompanied by an increase in their mitotic activity and intensity of specialization. The introduction of a GPCR/cAMP inhibitor after modeling ethanol-induced brain damage was accompanied by an increase in the secretion of neurotrophins by astrocytes and microglia.

Conclusion. The obtained results indicate the prospects of developing a new approach to the treatment of chronic alcohol-induced brain damage by targeting individual links in the intracellular signal transduction system, in particular, the use of GPCR/cAMP inhibitors.

Keywords: toxic brain damage, ethanol, JAC/STAT inhibitor, GPCR/cAMP inhibitor, neurotrophins, neural stem cells, cerebroprotective agents

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. Tatiana Yu. Polyakova, Larisa A. Miroshnichenko and Alexander V. Chaikovskii studied literary sources, conducted an experimental study and statistical processing of the results, participated in writing the text of the article. Mikhail V. Belousov, Vladimir I. Agafonov participated in writing and approving the text of the article. Gleb N. Zyuzkov developed the design of the experiment, carried out the final correction of the article.

Funding. This work was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education's state assignment, Project FGWM-2022-0018.

For citation: Polyakova T. Yu., Miroshnichenko L. A., Chaikovskii A. V., Belousov M. V., Agafonov V. I., Zyuz'kov G. N. Correction of psychoneurological disorders arising against the background of chronic toxic brain damage with inhibitors of GPCR/cAMP and JAC/STAT signaling pathways. *Drug development & registration*. 2026;15(1):192–201. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2045

ВВЕДЕНИЕ

Длительное токсическое воздействие алкоголя на головной мозг сопровождается ухудшением памяти, утратой имеющихся знаний и навыков, что вызвано реорганизацией ЦНС и изменением функциональной активности многих ее структур [1–3]. При этом церебропротекторные и ноотропные препараты способны оказывать воздействие лишь на сохранившиеся в условиях длительной интоксикации клетки нервной ткани, что, к сожалению, никак не может предупредить прогрессирующий характер поражения головного мозга [1, 4]. Исходя из этого, можно сделать заключение, что поиск принципиально новых способов лекарственного лечения этаноловой нейродегенерации, безусловно, востребован для практической медицины.

Известно, что нарушение функционирования ЦНС при употреблении этанола связано с утратой возможности полноценного нейрогенеза [5]. Фармакологическое воздействие на функциональную активность регенераторно-компетентных клеток нервной ткани с целью усиления репаративных процессов в поврежденных участках мозга является достаточно перспективным. При этом эффективность процессов клеточного обновления будет зависеть от функциональной активности прогениторных клеток и клеток глии [6], так как нейральные стволовые клетки (НСК) и коммитированные прогениторные клетки (КПН) могут образовывать нейроны *de novo* и макроглиальные клетки взамен поврежденных или погибших, а резидентные мезенхимальные прекурсоры дают начало микроглиальным клеткам [7]. Нейроглия, в свою очередь, регулирует процессы нейро-, синапто- и нейритогенеза за счет продукции ряда гуморальных факторов и образования непосредственных межклеточных контактов с прогениторами и вновь образующимися специализированными клетками [8].

Научная литература последних лет содержит обширный перечень публикаций, доказывающих возможность регуляции функций НСК и КПН путем таргетного влияния на определенные участки внутриклеточных сигнальных путей [9]. Одними из ведущих сигнальных каскадов, задействованных в контроле пролиферативной и дифференцировочной активности нейральных и нейрональных стволовых клеток, в том числе на фоне алкогольного поражения головного мозга, считаются GPCR/cAMP-зависимый путь и JAK/STAT-сигналинг. В экспериментах *in vitro* нами показано, что блокада аденилатциклазы (АС) в нейральных стволовых клетках длительно алкоголизированных животных приводит к возрастанию их пролиферативной активности, а использование селективного ингибитора STAT стимулирует процессы пролиферации как НСК, так и КПН [10]. Таким образом, цель настоящего исследования – в условиях этанолиндуцированного поражения головного мозга изучить влияние ингибиторов JAK/STAT и GPCR/cAMP на психоневрологический статус, состояние пулов стволовых клеток нервной ткани и секрецию нейротрофинов отдельными типами нейроглиальных клеток экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проведена на 90 мышах линии C57BL/6 в возрасте 2–2,5 месяцев, масса животных 18–20 г. Мыши относились к 1 категории (конвенциональные) и содержались в соответствии с принципами гуманного отношения к экспериментальным животным. Содержание мышей и дизайн исследования одобрены комитетом по биомедицинской этике НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН (протокол № 225012024 от 15.02.2024).

Хроническое токсическое поражение головного мозга моделировали внутрижелудочным введением 30%-го раствора этанола в дозе 3 г/кг/сут на протяжении 8 недель, питьевая вода в поилках заменялась на 5%-й раствор этанола. Контрольные животные получали внутрижелудочно аналогичный объем питьевой воды [11].

Ингибиторы JAK/STAT (SH-4-54 – CAS 1456632-40-8, Sigma-Aldrich, США) в дозе 10 мкг/кг и GPCR/cAMP (SQ 22536, Sigma-Aldrich, США) в дозе 15 мкг/кг вводили подкожно ежедневно на протяжении недели, начиная с 11 дня от момента последнего введения алкоголя. Согласно дизайну исследования день первого введения препаратов обозначаем как «1». Контрольной группе подкожно вводили аналогичный объем растворителя, которым являлся диметилсульфоксид.

Функциональные методы применялись для оценки психофармакологических влияний ингибиторов. На 3, 7, 14 и 21-е сут регистрировались параметры ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле (оценивали раздельно 1-ю и 2–3-ю мин), на 7, 14 и 21-е сут определялась сохранность условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), выработка которого проводилась в день, предшествующий введению ингибиторов [12].

Содержание и функциональную активность НСК и КПН оценивали путем культивирования на 3 и 7-е сут исследования нефракционированных клеток и выделенных иммуномагнитной сепарацией клеток PSA-NCAM ($CD56^+$) субвентрикулярной зоны (СВЗ) больших полушарий головного мозга соответственно [13]. Нефракционированные и $PSA\text{-}NCAM^+$-клетки выращивали 5 сут в питательной среде MACS Neuro Medium (Miltenyi Biotec, Германия) в CO_2-инкубаторе (37 °C, 5 % CO_2 и 100 % влажность). После инкубации в обоих случаях (при культивировании нефракционированных клеток и $PSA\text{-}NCAM^+$-клеток) определяли количество колониеобразующих единиц, скорость пролиферации и темпы созревания [10].

Элементы глии (астроциты – $ACSA\text{-}2^+$-клетки; олигодендроглиоциты – $O4^+$-клетки; микроглию – $CD11b^+$-клетки) выделяли иммуномагнитной сепарацией (Miltenyi Biotec, Германия) клеток СВЗ. С целью получения супернатантов глиальные клетки выращивали 2 сут в питательной среде MACS Neuro Medium (Miltenyi Biotec, Германия) в CO_2-инкубаторе (37 °C, 5 % CO_2 и 100 % влажность). По числу выросших нейросфер в тест-системах оценивали суммарную секреторную активность глиоцитов, то есть уровень нейротрофинов в супернатантах [14].

Статистическую обработку данных проводили с использованием STATISTICA for Windows, v. 12.0 (StatSoft Inc., США), применяя непараметрический U-критерий Манна – Уитни, уровень достоверности различий между группами $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У алкоголизированных животных выявлены явные нарушения психоневрологического статуса, что выражалось в значительном увеличении общей двигательной активности, в первую очередь за счет роста числа горизонтальных перемещений животных в тесте «Открытое поле» на протяжении всех сроков исследования (таблица 1). Вышеназванные изменения были зафиксированы в первый (на 3, 7, 14, 21-е сут) и во второй (на 3, 7, 21-е сут) периоды исследования. Также отмечалось значительное ухудшение воспроизведения УРПИ на протяжении всех сроков оценки (минимальное снижение до 42,7 % от исходного значения у интактных животных на 21-е сут эксперимента) (таблица 2).

Таблица 1. Ориентировочно-исследовательские параметры в «Открытом поле» у интактных мышей линии C57BL/6 (1); у контрольных животных на фоне длительного введения этанола (2); у мышей с подкожным введением ингибитора JAC/STAT (3) и ингибитора GPCR/cAMP (4) в условиях алкогольного поражения головного мозга, в усл. ед. (*m* ± SEM)

Table 1. Orientation and exploratory parameters in the open field in intact C57BL/6 mice (1); in control animals against the background of long-term ethanol administration (2); in mice with subcutaneous administration of a JAC/STAT inhibitor (3) and a GPCR/cAMP inhibitor (4) under conditions of alcohol-induced brain damage, arb. units (*m* ± SEM)

Группы животных Groups of animals	Суммарная двигательная активность Total locomotor activity	Горизонтальная активность Horizontal activity	Вертикальная активность Vertical activity	Норковый рефлекс Hole-board exploration	Груминг Self-grooming
3-и сут 3rd day					
В первый период исследования (1 мин) During the first period of the study (1 min)					
1	14,79 ± 2,34	8,23 ± 1,62	2,23 ± 0,41	3,17 ± 0,70	0,13 ± 0,08
2	37,25 ± 4,15*	26,27 ± 1,85*	5,43 ± 0,5*	5,40 ± 0,92	0,33 ± 0,26
3	41,31 ± 2,84*	28,54 ± 2,09*	4,76 ± 0,39*	7,31 ± 0,31*	0,40 ± 0,03
4	38,2 ± 4,36*	26,1 ± 1,24*	5,23 ± 0,54*	5,47 ± 0,75	0,13 ± 0,07
Во второй период исследования (2–3 мин) During the second period of the study (2–3 min)					
1	38,43 ± 3,37	21,5 ± 2,71	3,05 ± 0,59	11,43 ± 2,89	0,53 ± 0,09
2	56,34 ± 5,32*	34,57 ± 4,41*	5,23 ± 0,53*	13,80 ± 2,31	0,27 ± 0,15

Окончание таблицы 1

Группы животных Groups of animals	**Суммарная двигательная активность** Total locomotor activity	**Горизонтальная активность** Horizontal activity	**Вертикальная активность** Vertical activity	**Норковый рефлекс** Hole-board exploration	**Груминг** Self-grooming
3	55,46 ± 2,67*	32,89 ± 2,33*	5,73 ± 0,31*	14,24 ± 1,32	0,59 ± 0,04
4	54,24 ± 2,88*	31,17 ± 3,12*	5,57 ± 0,50*	15,78 ± 2,95	0,33 ± 0,11
7-е сут Day 7					
В первый период исследования (1 мин) During the first period of the study (1 min)					
1	20,5 ± 2,35	15,77 ± 1,70	1,70 ± 0,40	1,68 ± 0,50	0,59 ± 0,26
2	29,39 ± 2,14*	22,48 ± 1,88*	2,95 ± 1,02	2,89 ± 0,98	0,42 ± 0,15
3	30,77 ± 3,29*	23,84 ± 2,54*	4,46 ± 0,69*	1,31 ± 0,61	0,21 ± 0,09
4	21,37 ± 2,45#	15,97 ± 1,45#	2,10 ± 0,69	2,07 ± 0,48	0,26 ± 0,12
Во второй период исследования (2–3 мин) During the second period of the study (2–3 min)					
1	17,39 ± 1,94	11,89 ± 1,49	2,14 ± 0,29	1,63 ± 0,48	0,59 ± 0,39
2	32,6 ± 3,07*	20,90 ± 3,16*	4,58 ± 0,7*	2,97 ± 1,0	0,45 ± 0,16
3	28,61 ± 3,16*	18,67 ± 2,69*	4,41 ± 0,87*	3,67 ± 0,85*	0,29 ± 0,16
4	22,77 ± 2,15#	15,17 ± 1,87#	2,37 ± 0,89	2,07 ± 0,49	0,37 ± 0,17
14-е сут Day 14					
В первый период исследования (1 мин) During the first period of the study (1 min)					
1	20,37 ± 2,01	15,11 ± 1,88	2,37 ± 0,41	2,07 ± 0,41	0,13 ± 0,09
2	27,16 ± 1,86*	22,3 ± 2,18*	2,20 ± 0,48	2,83 ± 0,68	0,19 ± 0,12
3	28,43 ± 3,41*	21,31 ± 2,89*	2,21 ± 0,47	3,00 ± 0,72	0,43 ± 0,26
4	21,54 ± 2,33#	16,27 ± 2,77#	2,27 ± 0,49	1,77 ± 0,30	0,13 ± 0,09
Во второй период исследования (2–3 мин) During the second period of the study (2–3 min)					
1	25,65 ± 2,39	17,7 ± 2,31	4,34 ± 0,88	1,99 ± 0,47	0,47 ± 0,19
2	26,27 ± 2,31	18,90 ± 2,43	2,43 ± 0,58	3,83 ± 1,08	0,39 ± 0,18
3	27,85 ± 4,57	20,22 ± 3,53	3,34 ± 0,81	2,69 ± 0,68	0,49 ± 0,24
4	27,21 ± 3,97	19,27 ± 4,4	3,18 ± 0,87	2,69 ± 0,48	0,57 ± 0,21
21-е сут 21st day					
В первый период исследования (1 мин) During the first period of the study (1 min)					
1	16,39 ± 1,31	13,43 ± 1,19	1,39 ± 0,51	0,97 ± 0,39	0,08 ± 0,06
2	22,96 ± 1,29*	19,31 ± 1,41*	1,40 ± 0,35	0,93 ± 0,20	0,38 ± 0,17
3	23,36 ± 3,13*	18,28 ± 1,79*	1,79 ± 0,39	1,75 ± 0,51	0,09 ± 0,07
4	18,63 ± 1,47	14,1 ± 1,56	1,31 ± 0,53	0,97 ± 0,35	0,12 ± 0,08
Во второй период исследования (2–3 мин) During the second period of the study (2–3 min)					
1	17,09 ± 1,61	10,18 ± 1,31	2,86 ± 0,91	2,14 ± 0,49	0,8 ± 0,31
2	23,47 ± 2,04*	17,09 ± 2,13*	1,60 ± 0,41	1,39 ± 0,61	1,33 ± 0,37
3	15,44 ± 3,88#	10,14 ± 2,62#	1,77 ± 0,68	2,15 ± 0,71	0,69 ± 0,29
4	14,14 ± 1,47#	8,87 ± 1,51#	1,80 ± 0,45	1,47 ± 0,32	1,07 ± 0,34

Примечание. * Присутствуют достоверные различия показателей с аналогичными у интактных животных (группа 1) при $p < 0,05$.

Присутствуют достоверные различия показателей с аналогичными у животных с этанолиндуцированным поражением головного мозга (группа 2) при $p < 0,05$.

Note. * There are significant differences between the parameters and those in intact animals (Group 1) at $p < 0.05$.

There are significant differences between the parameters and those in animals with ethanol-induced brain damage (Group 2) at $p < 0.05$.

Таблица 2. Функциональные параметры условного рефлекса пассивного избегания у интактных мышей линии C57BL/6 (1); у контрольных животных на фоне длительного введения этанола (2); у мышей с подкожным введением ингибитора JAC/STAT (3) и ингибитора GPCR/cAMP (4) в условиях алкогольного поражения головного мозга (*m* ± SEM)

Table 2. Functional parameters of the conditioned passive avoidance reflex in intact C57BL/6 mice (1); in control animals with long-term ethanol administration (2); in mice with subcutaneous administration of a JAC/STAT inhibitor (3) and a GPCR/cAMP inhibitor (4) under conditions of alcohol-induced brain damage, (*m* ± SEM)

Группы наблюдения Observation groups	Число животных с сохранившимся рефлексом, % Number of animals with preserved reflex, %		
	7-е сутки Day 7	14-е сутки Day 14	21-е сутки 21st day
1	93,23 ± 4,53	66,57 ± 5,65	53,43 ± 4,16
2	66,77 ± 6,65*	33,43 ± 6,85*	23,43 ± 5,75*
3	69,56 ± 5,63	37,7 ± 5,85	0
4	86,77 ± 6,22#	56,77 ± 6,35#	43,43 ± 6,30#

Примечание.* Присутствуют достоверные различия показателей с аналогичными у интактных животных (группа 1) при $p < 0,05$.

Присутствуют достоверные различия показателей с аналогичными у животных с алкогольным поражением головного мозга (группа 2) при $p < 0,05$.

Note. * There are significant differences between the parameters and those in intact animals (Group 1) at $p < 0.05$.

There are significant differences between the parameters and those in animals with alcohol-induced brain damage (Group 2) at $p < 0.05$.

Представленные данные доказывают возникновение выраженной тревожности у животных на фоне длительного введения этанола (оценка двигательной активности в первую минуту наблюдения в «Открытом поле») и когнитивной дисфункции (оценка УРПИ и двигательной активности во 2–3-ю мин наблюдения в «Открытом поле»).

Таким образом, длительное введение алкоголя вызывает долго сохраняющиеся тяжелые функциональные расстройства ЦНС, соответствующие картине токсического поражения головного мозга [15].

Под влиянием ингибитора SH-4-54 не наблюдалось изменений ориентировочно-исследовательского поведения мышей на 3, 7 и 14-е сут эксперимента, высокий уровень их двигательной активности сохранялся за счет роста числа горизонтальных перемещений (см. таблицу 1). При этом на 21-е сут опыта на 2–3-й мин оценки фиксировалось уменьшение числа перемещений, что, с одной стороны, подтверждает высокую возбудимость животных, а с другой стороны – восстановление когнитивных способностей.

Уровень воспроизведения УРПИ на фоне получения блокатора SH-4-54 у животных с алкогольной нейродегенерацией значительно снижался (см. таблицу 2). Данный факт может быть связан с особенностями постановки эксперимента, так как ингибитор начинал вводиться уже через сутки после выработки УРПИ, что дает возможность изучать эффект фармакологического вещества на консолидацию и воспроизведение памятного следа [12]. Вероятно, именно эти процессы пострадали в первую очередь под воздействием ингибитора сигнальной молекулы JAC/STAT, что и проявилось прогрессирующим расстройством мнестической функции головного мозга.

Введение ингибитора SQ 22536 значительно корригировало проявления функциональных признаков патологии мозга алкогольного генеза (см. таблицы 1, 2). Наблюдалась отмена нарушений эксплоративного поведения мышей на 7 и 21-е сут как в первый, так и во второй период исследования (см. таблицу 1). Также на 14-е сут восстанавливалась общая двигательная и горизонтальная активность животных в тесте, но исключительно в первую минуту исследования. Кроме того, курсовое применение ингибитора SQ 22536 отменяло снижение уровня воспроизведения УРПИ у алкоголизированных мышей (см. таблицу 2). Весь период наблюдения статистически значимых различий этого показателя у леченных данным ингибитором мышей с таковым у интактных животных не регистрировалось.

Длительное введение этанола экспериментальным животным *per os* приводило к выраженному снижению содержания в СВЗ как мультипотентных НСК (до 62,1 %), так и коммитированных прогениторов (до 49,7 %) на 3-и сут по сравнению с интактными мышами (рисунки 1, 2). Данная картина явилась отражением снижения пролиферативного индекса обоих типов стволовых клеток нервной ткани (КПН – в 1,5 раза, НСК – в 2,6 раза в сравнении с интактом) на 3-и сут опыта (рисунки 1, 2). В то же время на 7-е сут отмечался рост числа НСК в синтетическом периоде митоза (до 135,6 % от уровня этого показателя у интактных мышей). Этанолиндуцированное поражение сопровождалось снижением скорости дифференцировки мультипотентных НСК на 3-и сут до 76,7 % и возрастанием данного показателя на 7-е сут до 124,7 % от уровня контрольных животных.

При этом было зафиксировано отсутствие изменений скорости специализации коммитированных предшественников нейронов (см. рисунки 1, 2). Таким образом, результаты экспериментов указывают на выраженную недостаточность и несбалансированность систем клеточного обновления ЦНС при хронической алкоголизации.

Оценка нейрорегенераторных возможностей ингибитора SH-4-54 в условиях моделирования этанолиндуцированной патологии мозга выявила рост числа НСК в СВЗ головного мозга на 3, 7-е сут до 124,0 и 143,9 % соответственно от данных значений у мышей без лечения. Обнаруженные изменения можно

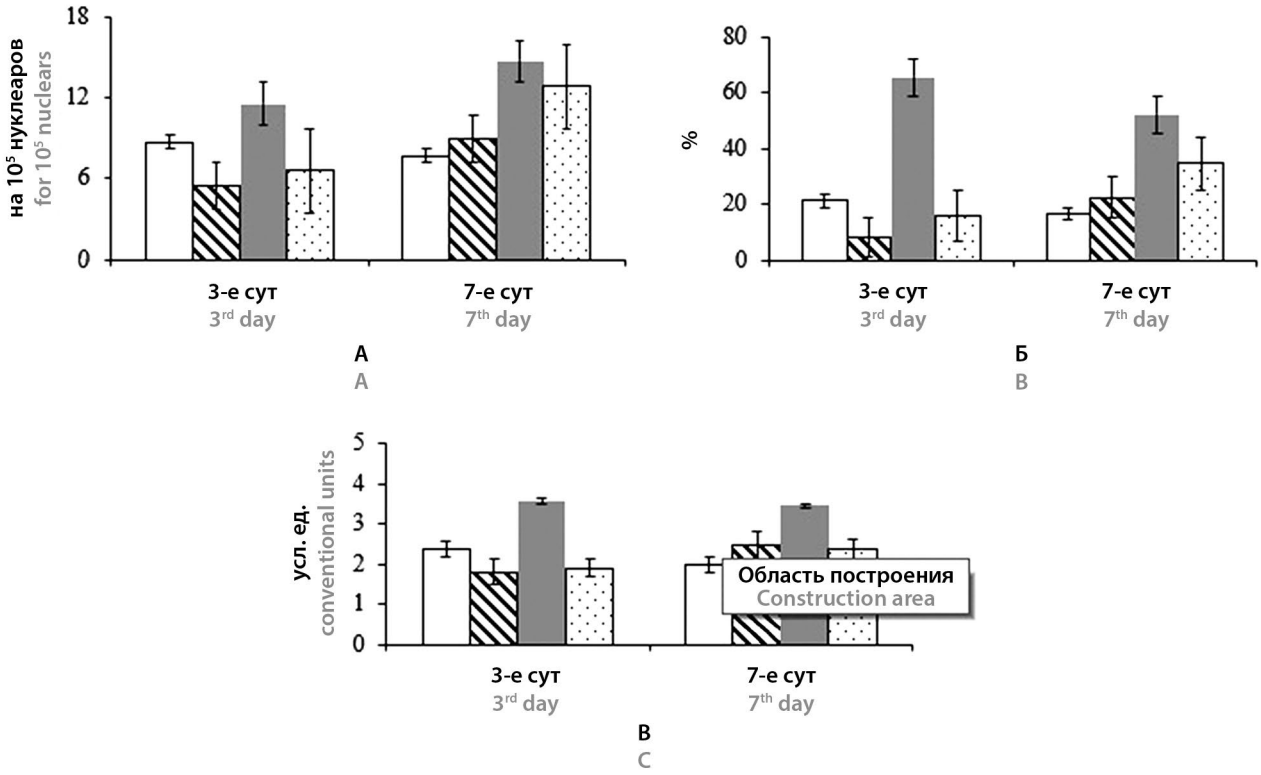


Рисунок 1. Содержание нейральных клеток-предшественников в паравентрикулярной области головного мозга мышей линии C57BL/6 (А), их количество в S-фазе клеточного цикла (В) и индекс дифференцировки (С): белые столбики – интактные мыши; заштрихованные столбики – мыши после моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга; серые столбики – мыши, получавшие ингибитор SQ 22536; столбики с точками – мыши, получавшие ингибитор SH-4-54 на фоне моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга. По оси абсцисс – сроки исследования (сут); по оси ординат – значения показателя:

А – ×10⁵ нуклеаров; В – в %; С – в усл. ед. Доверительные интервалы при *P* ≤ 0,05

Figure 1. Count of neural progenitor cells in the paraventricular region of the brain of C57BL/6 mice (A), their number in S-phase of the cell cycle (B) and differentiation index (C): white bars – intact mice; hatched bars – mice with alcohol-induced brain damage; grey bars – mice treated with a SQ 22536 inhibitor; bars with dots – mice treated with a SH-4-54 inhibitor against the background of modeling of alcohol-induced brain damage. The abscissa axis shows the study time (days); the ordinate axis – the values of the indicator:

A – per ×10⁵ nuclear cells; B – in %; C – in conventional units. Confidence intervals at *P* ≤ 0.05

считать результатом выраженного усиления пролиферативной активности НСК. Число мультипотентных стволовых клеток в синтетическом периоде митоза достигало 195,7 и 153,3 % соответственно по сравнению с животными, не получавшими ингибиторов сигнальной трансдукции (рисунок 1, Б). В то же время нами было зафиксировано отсутствие значимых изменений скорости дифференцировки нейральных стволовых клеток, а также отсутствие количественных и функциональных изменений (уровень пролиферации и дифференцировки) в отделе коммитированных нейрональных прекурсоров на фоне блокады JAC/STAT-сигналинга у алкоголизированных животных (рисунок 2, А, Б, В).

В группе животных, получавших ингибитор SQ 22536, напротив, отмечалось существенное возрастание числа как НСК до 213 и 164,5 %, так и КПН до 440 и 161 % в СВЗ на 3, 7-е сут наблюдения соответственно по сравнению с алкоголизированными животными (рисунки 1, А и 2, А). В основе выявленного феномена лежало повышение их митотической активности. Количество НСК и КПН в S-фазе клеточного цикла было наибольшим на 3-и сут исследования (до 799,3 и 352,4 % от аналогичных показателей у нелеченых мышей соответственно) (рисунки 1, Б и 2, Б). Также значительно увеличивалась интенсивность специализации НСК на 3, 7-е сут наблюдения (с максимумом до 151,7 % от интактного контроля на 3-и сут) (рисунок 1, С). Изменений скорости созревания КПН при этом не регистрировалось (рисуунок 2, С).

Моделирование алкогольного поражения головного мозга сопровождалось увеличением продукции нейротрофинов, стимулирующих функции прогениторов нервной ткани, астроцитами и олигодендроци-

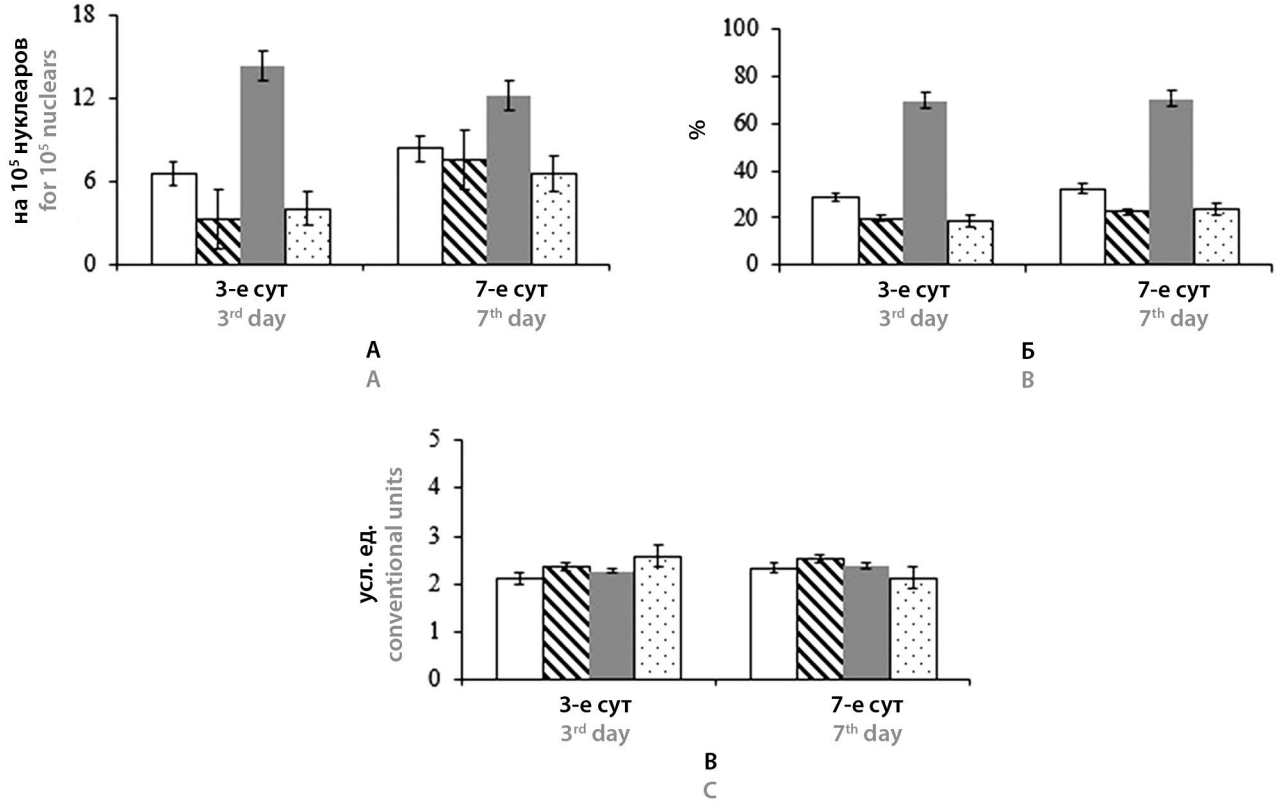


Рисунок 2. Содержание нейрональных коммитированных клеток-предшественников в паравентрикулярной области головного мозга мышей линии C57BL/6 (А), их количество в S-фазе клеточного цикла (В) и индекс дифференцировки (С): белые столбики – интактные мыши; заштрихованные столбики – мыши после моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга; серые столбики – мыши, получавшие ингибитор SQ 22536; столбики с точками – мыши, получавшие ингибитор SH-4-54 на фоне моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга. По оси абсцисс – сроки исследования (сут); по оси ординат – значения показателя:

А – ×10⁵ нуклеаров; В – в %; С – в усл. ед. Доверительные интервалы при $P \leq 0,05$

Figure 2. Count of neuronal committed progenitor cells in the paraventricular region of the brain of C57BL/6 mice (A), their number in S-phase of the cell cycle (B) and differentiation index (C): white bars – intact mice; hatched bars – mice with alcohol-induced brain damage; grey bars – mice treated with a SQ 22536 inhibitor; bars with dots – mice treated with a SH-4-54 inhibitor against the background of modeling of alcohol-induced brain damage. The abscissa axis shows the study time (days); the ordinate axis – the values of the indicator:

A – per ×10⁵ nuclear cells; B – in %; C – in conventional units. Confidence intervals at $P \leq 0.05$

тами на протяжении всех сроков исследования (рисунок 3). При этом уровень изменений секреторной функции был существенно более высокий (с максимумом до 228,6 % от аналогичного параметра у интактных животных на 3-и сут наблюдения) у олигодендроцитов. Другая закономерность регистрировалась со стороны микроглии. Этанолиндуцированная нейродегенерация приводила к выраженному снижению продукции ростовых факторов этими иммунокомпетентными клетками (до 58,8 и 70,1 % от интактного контроля на 3-и и 7-е сут исследования) (рисунок 3). Выявленные феномены, очевидно, являлись отражением компенсаторной реакции макроглии на поражение головного мозга нейротоксическим воздействием [16]. Зафиксированное падение колониеобразующей активности микроглиальных супернатантов, возможно, объясняется сдвигом секреции в сторону наработки провоспалительных цитокинов (угнетающих пролиферацию прогениторов [17]).

Терапия животных с алкогольным поражением ингибитором SH-4-54 приводила к увеличению секреторной активности астроглии и микроглии на 3-и сут до 166,7 и 183,3 % и на 7-е сут до 170,8 и 189,6 % соответственно от уровня контроля (рисунок 3, А, С). Продукция нейротрофинов олигодендроцитами значимо снижалась на 3-и и 7-е сутки исследования (до 54,4 и 52,7 % соответственно) по сравнению с контролем и уже не имела выраженных отличий от уровня секреции $O4^+$-клетками интактных мышей (рисунок 3, Б).

Введение ингибитора SQ 22536 после моделирования этанолиндуцированной нейродегенерации сопровождалось выраженным повышением секреции нейротрофических ростовых факторов астроцитами

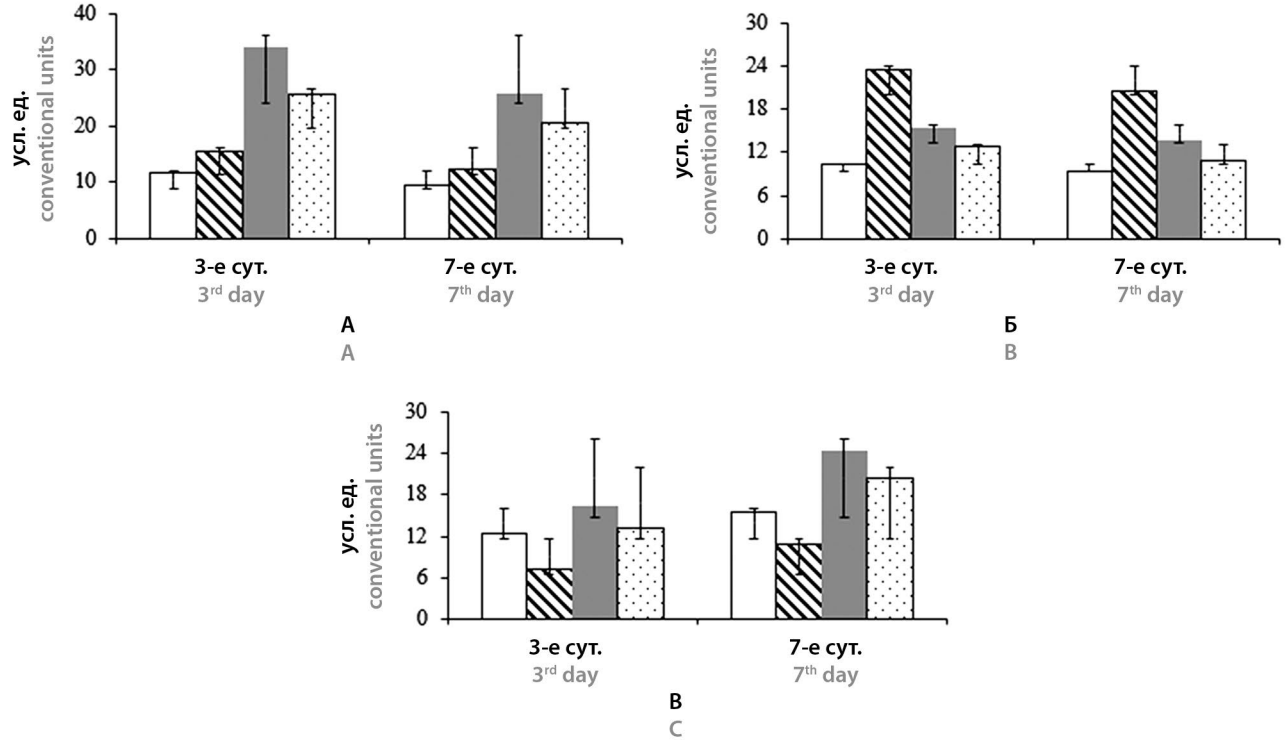


Рисунок 3. Влияние кондиционированных сред астроцитов (А); олигодендроцитов (В) и клеток микроглии (С) на уровень нейросферообразования в тест-системе: белые столбики – интактные мыши; заштрихованные столбики – мыши после моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга; серые столбики – мыши, получавшие ингибитор SQ 22536; столбики с точками – мыши, получавшие ингибитор SH-4-54 на фоне моделирования этанолиндуцированного поражения головного мозга. По оси абсцисс – сроки исследования (сут); по оси ординат – значения показателя (×10⁵ нуклеаров). Доверительные интервалы при *P* ≤ 0,05

Figure 3. Effect of conditioned media of astrocytes (A); oligodendrocytes (B) and microglial cells (C) on the level of neurosphere formation in the test system: white bars – intact mice; hatched bars – mice with alcohol-induced brain damage; grey bars – mice treated with a SQ 22536 inhibitor; bars with dots – mice treated with a SH-4-54 inhibitor against the background of modeling of alcohol-induced brain damage. The abscissa axis shows the study time (days); the ordinate axis shows the values of the indicator (per ×10⁵ nuclear cells). Confidence intervals at *P* ≤ 0.05

и микроглией на 3-и и 7-е сут исследования. При этом наиболее существенное увеличение секреторной активности ACSA-2⁺-клетками наблюдалось на 3-и сут (до 224,4 % от контроля), а клетками микроглии – на 7-е сут (до 227,5 % от контроля) (рисунок 3, А, С). При этом секреция нейротрофинов олигодендроцитами уменьшалась на 3-и и 7-е сут (до 65,8 и 66,1 % от контроля соответственно) в сравнении с данным показателем в группе животных, не получавших блокатор SQ 22536 (рисунок 3, В).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о выраженных нарушениях в функционировании «глубокого резерва» нервной ткани (стволовых клеток) в условиях хронического алкогольного поражения головного мозга. Это обстоятельство, безусловно, препятствует процессу эффективного нейрогенеза [18].

При этом проведенные исследования свидетельствуют о принципиальной возможности восстановления ростового потенциала прогениторов нервной ткани путем модификации в них внутриклеточной сигнализации. Так, получены данные, подтверждающие факт влияния блокатора SH-4-54 на психоневрологический статус мышей в условиях моделирования алкогольной нейродегенерации, но однозначно трактовать характер этих изменений невозможно. Это значит, что обнаруженные феномены нуждаются в дальнейшем изучении.

В то же время данные экспериментов позволяют говорить о выраженных нейропротекторных и нейрорегенеративных свойствах блокатора SQ 22536 в условиях этаноловой нейродегенерации. В этих условиях ингибирование образования cAMP ведет к быстрому восстановлению морфофункционального состояния головного мозга и нормализации целого ряда нарушений в работе ЦНС. Это касается показателей двигательной активности, исследовательского поведения, когнитивной и мнестической функций. Безусловно, ведущее значение в восстановительных процессах принадлежит именно репарации нервной

ткани, связанной с активацией резидентных мультипотентных НСК и коммитированных предшественников нейронов (относящихся к наиболее мобильному отделу тканеспецифической регенерации). Падение уровня cAMP в клетке ускоряет пролиферацию НСК и КПН, дифференцировку НСК и образование специализированных клеток *de novo* [18]. Эти изменения реализации ростового потенциала прогениторов являются результатом как прямого стимулирующего действия на них ингибитора SQ 22536, так и повышения продукции нейротрофических ростовых факторов астроцитами и микроглиальными клетками.

При этом обнаружено, что блокада cAMP в олигодендроцитах при этанолиндуцированном поражении головного мозга вызывает снижение их секреторной активности. Однако известно, что основная функция данных клеток заключается в миелинизации аксонов [19]. Поэтому, возможно, данный факт не сказался на суммарном эффекте гуморальной поддержки нейроглией прогениторов нервной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты доказывают перспективность разработки нового таргетного подхода к терапии хронического алкогольного поражения головного мозга путем воздействия на определенные звенья внутриклеточных сигнальных каскадов, в частности применение ингибиторов GPCR/cAMP.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Livingston G., Huntley J., Sommerlad A., Ames D., Ballard C., Banerjee S., Brayne C., Burns A., Cohen-Mansfield J., Cooper C., Costafreda S. G., Dias A., Fox N., Gitlin L. N., Howard R., Kales H. C., Kivimäki M., Larson E. B., Ogunniyi A., Orgeta V., Ritchie K., Rockwood K., Sampson E. L., Samus Q., Schneider L. S., Selbæk G., Teri L., Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*. 2020;396(10248):413–446. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6.
2. Lees B., Meredith L. R., Kirkland A. E., Bryant B. E., Squeglia L. M. Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2020;192:172906. DOI: 10.1016/j.pbb.2020.172906.
3. Mudyanselage A. W., Wijamunige B. C., Kocon A., Turner R., McLean D., Morentin B., Callado L. F., Carter W. G. Alcohol Triggers the Accumulation of Oxidatively Damaged Proteins in Neuronal Cells and Tissues. *Antioxidants*. 2024;13(5):580. DOI: 10.3390/antiox13050580.
4. Gupta A., Khan H., Kaur A., Singh T. G. Novel Targets Explored in the Treatment of Alcohol Withdrawal Syndrome. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. 2021;20(2):158–173. DOI: 10.2174/1871527319999201118155721.
5. Crews F. T., Macht V., Vetreno R. P. Epigenetic regulation of microglia and neurons by proinflammatory signaling following adolescent intermittent ethanol (AIE) exposure and in human AUD. *Advances in Drug and Alcohol Research*. 2024;4:12094. DOI: 10.3389/adar.2024.12094.
6. Chang H.-M., Wu H.-C., Sun Z.-G., Lian F., Leung P. C. K. Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Human Reproduction Update*. 2019;25(2):224–242. DOI: 10.1093/humupd/dmy047.
7. Amidfar M., de Oliveira J., Kucharska E., Budni J., Kim Y.-K. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sciences*. 2020;257:118020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118020.
8. Yang C.-H., Di Antonio A., Kirschen G. W., Varma P., Hsieh J., Ge S. Circuit Integration Initiation of New Hippocampal Neurons in the Adult Brain. *Cell Reports*. 2020;30(4):959–968. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.12.084.
9. Poser S. W., Chenoweth J. G., Colantuoni C., Masjkur J., Chrousos G., Bornstein S. R., McKay R. D., Androutsellis-Theotokis A. Concise Review: Reprogramming, Behind the Scenes: Noncanonical Neural Stem Cell Signaling Pathways Reveal New, Unseen Regulators of Tissue Plasticity With Therapeutic Implications. *Stem Cells Translational Medicine*. 2015;4(11):1251–1257. DOI: 10.5966/sctm.2015-0105.
10. Zyuz'kov G. N., Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Zhdanov V. V., Simanina E. V., Stavrova L. A., Danilets M. G. Specific Features of Intracellular Signal Transduction in the Regulation of Functions of Neural Stem Cells and Committed Neuronal Progenitors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;170(4):522–527. DOI: 10.1007/s10517-021-05100-y.
11. Bertola A. Mouse Model of Alcoholic Steatohepatitis. *Methods in Molecular Biology*. 2020;2164:145–157. DOI: 10.1007/978-1-0716-0704-6_15.
12. Nesterova Yu. V., Povet'eva T. N., Suslov N. I., Zyuz'kov G. N., Zhdanov V. V., Fedorova Yu. S., Kul'pin P. V., Shaposhnikov K. V. Correction of Cholinergic Abnormalities in Mnestic Processes with Diterpene Alkaloid Songorine. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165(1):10–13. DOI: 10.1007/s10517-018-4087-9.
13. Kumar A., Pareek V., Faiq M. A., Kumar P., Kumari C., Singh H. N., Ghosh S. K. Transcriptomic analysis of the signature of neurogenesis in human hippocampus suggests restricted progenitor cell progression post-childhood. *IBRO Reports*. 2020;9:224–232. DOI: 10.1016/j.ibror.2020.08.003.
14. Kantzer C. G., Boutin C., Herzig I. D., Wittwer C., Reiß S., Tiveron M. C., Drewes J., Rockel T. D., Ohlig S., Ninkovic J., Cremer H., Pennartz S., Jungblut M., Bosio A. Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia*. 2017;65:990–1004. DOI: 10.1002/glia.23140.
15. Visontay R., Rao R. T., Mewton L. Alcohol use and dementia: new research directions. *Current Opinion in Psychiatry*. 2021;34(2):165–170. DOI: 10.1097/YCO.0000000000000679.
16. Cserép C., Pósfai B., Dénes Á. Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron*. 2021;109(2):222–240. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.11.007.
17. Hu Z., Deng N., Liu K., Zhou N., Sun Y., Zeng W. CNTF-STAT3-IL-6 Axis Mediates Neuroinflammatory Cascade across Schwann Cell-Neuron-Microglia. *Cell Reports*. 2020;31(7):107657. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107657.
18. Cooper I. A., Beecher K., Chehrehasa F., Belmer A., Bartlett S. E. Tumour Necrosis Factor in Neuroplasticity, Neurogenesis and Alcohol Use Disorder. *Brain Plasticity*. 2020;6(1):47–66. DOI: 10.3233/BPL-190095.
19. Xin W., Chan J. R. Myelin plasticity: sculpting circuits in learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020;21(12):682–694. DOI: 10.1038/s41583-020-00379-8.

Оригинальная статья / Research article

УДК 616.36; 616.36-072.7; 616-092.9

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2256

Check for updates

CC BY 4.0

Адаптация протокола пробы Квика – Пытеля для оценки антитоксической функции печени у мышей

В. А. Приходько[1]✉, Т. М. Матузок[1], В. Е. Карев[2], А. Б. Изотова[1], С. В. Оковитый[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (ФГБОУ ВО СПбГУ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

✉ **Контактное лицо:** Приходько Вероника Александровна. **E-mail:** vaprikhodko@mail.ru

ORCID: В. А. Приходько – https://orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Т. М. Матузок – https://orcid.org/0000-0002-1640-016X;
В. Е. Карев – https://orcid.org/0000-0002-7972-1286;
А. Б. Изотова – https://orcid.org/0000-0001-8356-1863;
С. В. Оковитый – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Статья поступила: 01.12.2025 **Статья принята в печать:** 17.12.2025 **Статья опубликована:** 19.12.2025

Резюме

Введение. Функциональные печеночные пробы являются актуальной группой методик скрининговой оценки состояния печени, применимых как в лабораторных исследованиях, так и в клинической практике. В эту группу в том числе входит проба Квика – Пытеля, основанная на ферментативной реакции образования гиппуровой кислоты из глицина и бензоата в печени. Эта проба отличается малой инвазивностью и сравнительной простотой выполнения, однако в настоящий момент отсутствует детализированный протокол ее проведения у мелких лабораторных животных.

Цель. Целью работы являлась адаптация протокола пробы Квика – Пытеля для оценки антитоксической функции печени у мышей.

Материалы и методы. Белым беспородным мышам-самцам ($n = 10$) вводили внутрибрюшинно нагрузочные дозы натрия бензоата и глицина в эквимолярном соотношении (504 мг/кг и 264 мг/кг соответственно), после чего в течение 18 ч собирали мочу в метаболических клетках. После пробоподготовки титровали образовавшуюся гиппуровую кислоту 0,01 Н раствором калия гидроксида в присутствии 1%-го раствора фенолфталеина. Через 1 неделю после измерения мышам вводили тетрахлорметан (1 мл/кг) для индукции острого токсического гепатита, после чего проводили пробу повторно. Поражение печени верифицировали гистологически с окрашиванием гематоксилином и эозином.

Результаты и обсуждение. После введения тетрахлорметана концентрация гиппуровой кислоты в моче статистически значимо ($p < 0,01$) снизилась более чем на 50 % от исходного уровня. В образцах печени при этом наблюдали характерную морфологическую картину острого токсического гепатита.

Заключение. Проведена адаптация протокола пробы Квика – Пытеля для мышей и подтверждена ее применимость для оценки антитоксической функции печени при остром поражении. Описанная в работе методика проста в исполнении, не требует существенных затрат и может быть использована для рутинной оценки функционального состояния печени у мелких лабораторных животных.

Ключевые слова: проба Квика – Пытеля, функциональные печеночные пробы, печень, лабораторная диагностика, мыши

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

Вклад авторов. В. А. Приходько – идея и планирование исследования. В. А. Приходько, Т. М. Матузок, В. Е. Карев – проведение экспериментов и обработка данных. В. А. Приходько, В. Е. Карев – подготовка иллюстраций. В. А. Приходько, А. Б. Изотова, С. В. Оковитый – подготовка и редактура рукописи.

© Приходько В. А., Матузок Т. М., Карев В. Е., Изотова А. Б., Оковитый С. В., 2026
© Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Karev V. E., Izotova A. B., Okovityi S. V., 2026

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

Для цитирования: Приходько В. А., Матузок Т. М., Карев В. Е., Изотова А. Б., Оковитый С. В. Адаптация протокола пробы Квика – Пытеля для оценки антитоксической функции печени у мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):202–209. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2256

Adaptation of the Quick – Pytel test protocol for the assessment of liver antitoxic function in mice

Veronika A. Prikhodko[1]✉, Tatyana M. Matuzok[1], Vadim E. Karev[2], Anna B. Izotova[1], Sergey V. Okovityi[1]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] St. Petersburg State University. 7–9, Universitetskaya Embankment, Saint-Petersburg, 199034, Russia

✉ **Corresponding author:** Veronika A. Prikhodko. **E-mail:** vaprikhodko@mail.ru

ORCID: Veronika A. Prikhodko – https://orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Tatyana M. Matuzok – https://orcid.org/0000-0002-1640-016X;
Vadim E. Karev – https://orcid.org/0000-0002-7972-1286;
Anna B. Izotova – https://orcid.org/0000-0001-8356-1863;
Sergey V. Okovityi – https://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Received: 01.12.2025 **Accepted:** 17.12.2025 **Published:** 19.12.2025

Abstract

Introduction. Functional liver tests are a relevant group of methods for liver function screening, that can be used in a laboratory setting as well as in clinical practice. This group includes, among others, the Quick – Pytel test, which is based on the enzymatic formation of hippuric acid from glycine and benzoate in the liver. This test is minimally invasive and comparatively ease to perform, yet as of now, there is no detailed protocol to carry it out in small laboratory animals.

Aim. The objective of this work was to develop a protocol of the Quick – Pytel test to assess liver antitoxic function in small laboratory animals.

Materials and methods. Loading doses of sodium benzoate and glycine at an equimolar ratio (504 mg/kg and 264 mg/kg, respectively) were administered intraperitoneally to white outbred male mice ($n = 10$), after which urine samples were collected over 18 h in metabolic cages. Following sample preparation, the newly formed hippuric acid was titrated by 0.01 N potassium hydroxide in the presence of 1 % phenolphthalein. In 1 week, the mice were injected with carbon tetrachloride (1 mL/kg) to induce acute toxic hepatitis, and the test was repeated. Liver injury was confirmed morphologically with haematoxylin and eosin staining.

Results and discussion. Following carbon tetrachloride administration, urinary concentrations of hippuric acid decreased significantly ($p < 0.01$) by over 50 % from baseline. Liver samples exhibited characteristic features of acute toxic hepatitis.

Conclusion. We have developed a protocol of the Quick – Pytel test in mice and confirmed its applicability to assess liver antitoxic function under acute injury conditions. The method we describe is simple and straightforward, is relatively low-cost, and can be used in routine practice to assess liver function in small laboratory animals.

Keywords: the Quick – Pytel test, functional liver tests, liver, laboratory diagnostics, mice

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

Contribution of the authors. Veronika A. Prikhodko – study design and planning. Veronika A. Prikhodko, Tatyana M. Matuzok, Vadim E. Karev – experiment conduction and data analysis. Veronika A. Prikhodko, Vadim E. Karev – visualization. Veronika A. Prikhodko, Anna B. Izotova, Sergey V. Okovityi – manuscript writing and review.

Funding. The results of this work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of the Saint-Petersburg Chemical Pharmaceutical University" (agreement No. 075-15-2021-685 from 26 July 2021) with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Karev V. E., Izotova A. B., Okovityi S. V. Adaptation of the Quick – Pytel test protocol for the assessment of liver antitoxic function in mice. *Drug development & registration*. 2026;15(1):202–209. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2256

ВВЕДЕНИЕ

Острые и хронические заболевания печени сопровождаются снижением всех ее функций. Так называемые функциональные печеночные пробы (ФПП) представляют собой тесты, применяемые в рамках скрининга для оценки состояния печени, включая ее синтетическую, антитоксическую и экскреторную функции. Наибольшее распространение в настоящее время имеют ФПП, основанные на анализе печеночного клиренса красителей бромсульфофталеина (бром-сульфалеина) и индоцианина зеленого, а также ряд стабильноизотопных дыхательных тестов, таких как ^{13}C-аминопириновый и ^{13}C-метацетиновый [1]. Недостатком большинства из этих проб является необходимость спектрометрического или хроматографического определения вещества, что требует применения сложного и дорогостоящего оборудования, затрудняя рутинное проведение процедуры для мелких лабораторных животных.

В 1933 г. американский врач Арман Джеймс Квик (Armand James Quick) предложил первую в истории ФПП, основанную на титриметрическом определении в моче гиппуровой кислоты (ГК) [2], образующейся из бензойной кислоты и глицина путем ферментативной реакции в печени (рисунок 1). В 1941–1945 гг. советский уролог Антон Яковлевич Пытель модифицировал пробу Квика, адаптировав ее для клинического применения [3].

Для проведения пробы Квика – Пытеля пациенту дают на прием внутрь 4 г натрия бензоата со стаканом воды, после чего через 4 ч собирают мочу, в которой определяют содержание ГК алкалиметрическим или гравиметрическим методом [3]. Здоровый человек за 4 ч выделяет с мочой около 5,44 г ГК, что эквивалентно 3,7 г натрия бензоата, то есть 92,5 % его введенной дозы. Клиренс натрия бензоата от 88 % и выше свидетельствует о выполнении печенью своей антитоксической функции на 100 %. При 70–92 % функция печени считается умеренно нарушенной, при 50–69 % – значительно нарушенной и при менее 49 % – резко сниженной [3].

Целью нашего исследования стала оптимизация пробы Квика – Пытеля для лабораторных мышей и составление подробного протокола ее проведения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Базельской декларацией и Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств после одобрения биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ (протокол № Mice-02/Ct-24). Эксперименты были выполнены на 10 белых беспородных мышах-самцах возрастом 3 мес. и массой тела 18–22 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия) ФГУП «НИЦ «Курчатовский институт» одной партией и прошедших карантин в течение 14 дней. Мыши получали «Полнорационный экструдированный комбикорм ЛБК-120 для лабораторных животных (крыс, мышей)» (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия) и воду, соответствующую требованиям СанПиН 2.1.3684-21, со свободным доступом. Животные содержались при температуре 20–26 °C и относительной влажности 30–70 % с 12-часовым циклом освещения.

Для проведения ФПП мышам вводили внутрибрюшинно 504 мг/кг натрия бензоата (Merck KGaA, Германия) и 264 мг/кг глицина (Sigma-Aldrich, США) в виде свежеприготовленных растворов в 0,9%-м растворе натрия хлорида («Натрия хлорид – Солофарм», ООО «Гротекс», Россия). Для обеспечения водной нагрузки дополнительно вводили 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида внутрь с помощью зонда и еще 0,5 мл – подкожно. Помещали животных в метаболические клетки (Bioscape GmbH / ZOONLAB GmbH, Германия) со свободным доступом к корму и воде и через 18 ч собирали образцы мочи.

Фиксировали общий объем мочи и отбирали образец объемом от 100 до 500 мкл. Добавляли к образцу аммония сульфат (AppliChem GmbH, Германия) из соотношения 50 мг на 100 мкл образца, перемешивали и отфильтровывали (фильтры средней фильтрации «белая лента», ООО «Реакон», Россия). Проверя-

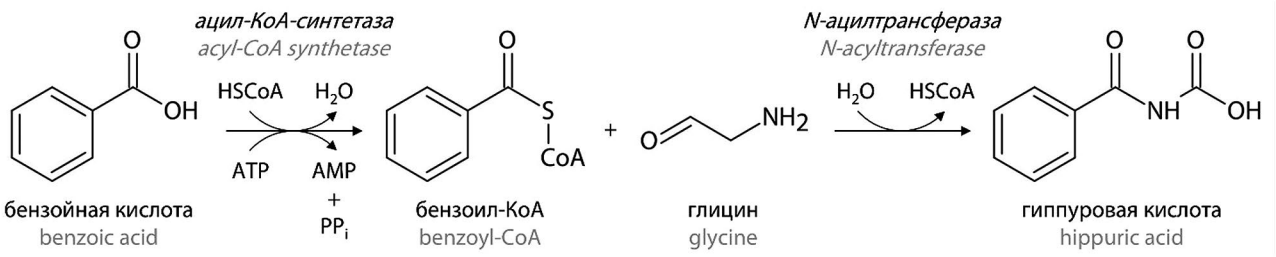


Рисунок 1. Биосинтез гиппуровой кислоты.
КоА, CoA – коэнзим А; ATP – аденозинтрифосфат; AMP – аденозинмонофосфат; PPi – неорганический фосфат

Figure 1. Biosynthesis of hippuric acid.
CoA – coenzyme A; ATP – adenosine triphosphate; AMP – adenosine monophosphate; PPi – inorganic phosphate

ли pH фильтрата и при необходимости подкисляли 0,01 Н раствором кислоты соляной (АО «ЛенРеактив», Россия) до pH ~ 5,0 по универсальной индикаторной бумаге (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия). Пробу оставляли при комнатной температуре на 2 ч для выпадения осадка, после чего повторно отфильтровывали. Смывали осадок с фильтра и доводили объем раствора дистиллированной водой до 100 мл. Нагревали пробу на водяной бане до 95 °С до полного растворения осадка. Отбирали 10 мл раствора и титровали 0,01 Н раствором калия гидроксида (АО «ЛенРеактив», Россия) в присутствии 1%-го раствора фенолфталеина в изопропаноле (ООО «НИИ ИТиМ», Россия) до слабой розовой окраски (рисунок 2).

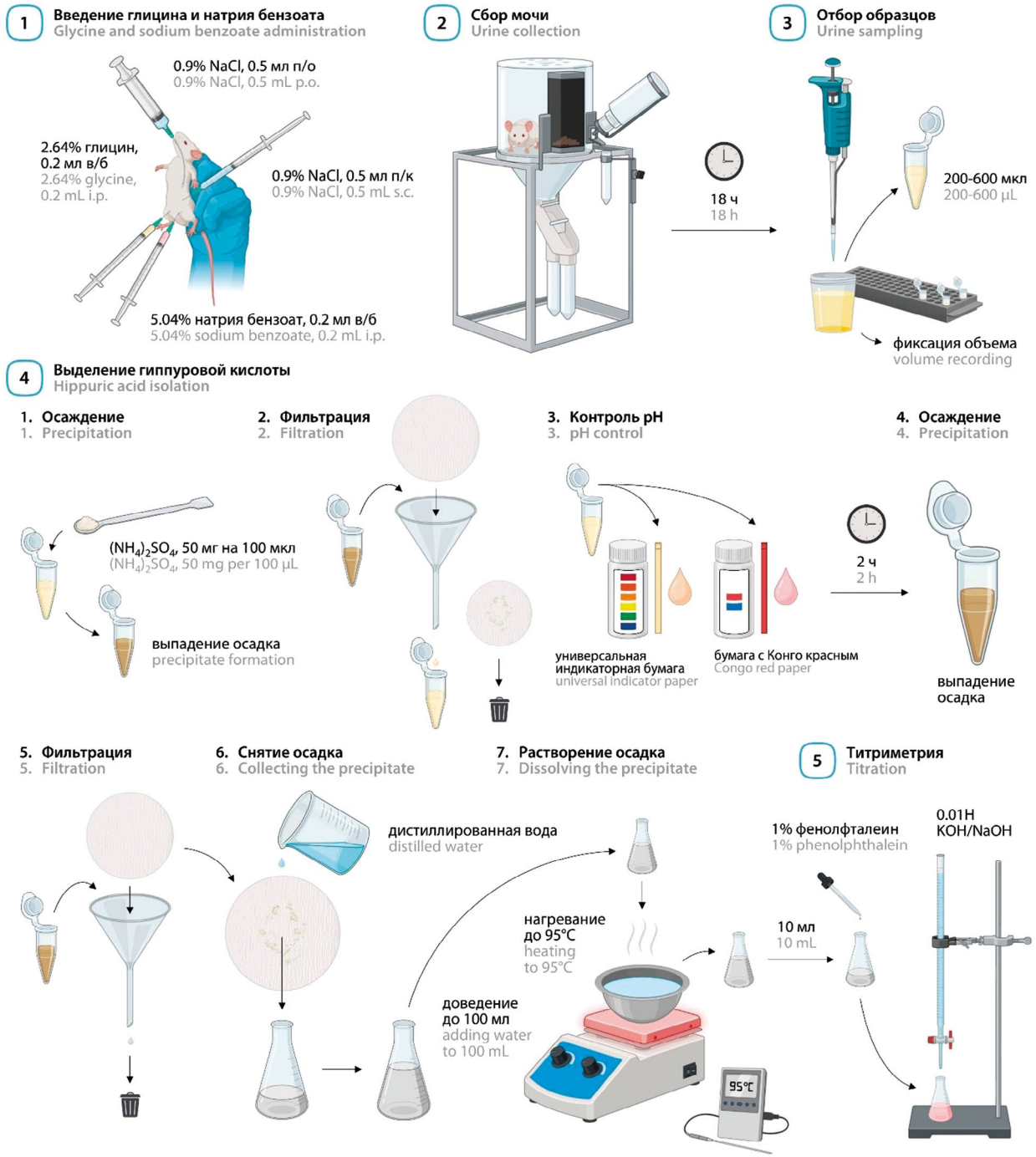


Рисунок 2. Алгоритм выполнения пробы Квика – Пытеля для мышей.

В/б – внутрибрюшинно; п/о – перорально; п/к – подкожно. Иллюстрация создана с использованием BioRender (www.biorender.com)

Figure 2. The algorithm for the Quick – Pytel test in mice.

I.p. – intraperitoneally; p.o. – per os; s.c. – subcutaneously. Illustration created using BioRender (www.biorender.com)

Фиксировали израсходованный объем титранта и рассчитывали концентрацию ГК в моче по формуле:

$$C = \frac{V_{КОН} \cdot 1{,}7917 \cdot 1000}{V_{образца} \cdot 179{,}17} \quad \text{или} \quad C = \frac{V_{КОН} \cdot 10}{V_{образца}},$$

где C (ммоль/л) – концентрация ГК в моче; 1,7917 (мг/мл) – масса ГК, реагирующая с 1 мл титранта; $V_{КОН}$ (мл) – израсходованный объем титранта; $V_{образца}$ (мл) – объем мочи, взятый для анализа; 179,17 (г/моль) – молярная масса ГК; 1000 – коэффициент для перевода единиц измерения.

Для индукции острого гепатита через 1 нед. после выполнения ФПП мышам вводили внутрибрюшинно 1 мл/кг тетрахлорметана [4] (АО «ЭКОС-1», Россия) в виде свежеприготовленного раствора (1 : 3 по объему) в миндальном масле (ООО «Аромамарка», Россия), после чего повторно выполняли ФПП по вышеописанному протоколу.

После отбора проб мочи животных подвергали эвтаназии углекислым газом (бокс Bioscape GmbH / ZOONLAB GmbH, Германия) и забирали образцы печени для гистологического исследования. Образцы помещали в 10%-й забуференный формалин и фиксировали в течение 24 ч. Далее образцы вырезали, помещали в гистологические кассеты и подвергали стандартной гистологической проводке в гистопроцессоре Thermo Scientific Excelsior AS (Thermo Shandon Ltd., Великобритания), после чего заливали в парафин и микротомировали с использованием ротационного микротома. Срезы толщиной 3–3,5 мкм помещали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали в проходящем свете с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Prism 10.4.1 (GraphPad Software Inc., США). С помощью W-критерия Шапиро – Уилка определяли нормальность распределения данных, после чего оценивали значимость различия групп с помощью парного t-теста. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция острого гепатита с помощью тетрахлорметана была ассоциирована с летальным исходом в 40 % случаев; для проведения парного сравнения использовали только данные выживших животных. Концентрации ГК в моче мышей составили 20,63 ± 2,11 и 9,35 ± 1,26 ммоль/л до и после индукции гепатита соответственно ($p < 0{,}01$) (рисунок 3, А).

Результаты гистологического исследования позволили верифицировать целевую патологию у экспериментальных животных. Во всех образцах наблюдали повреждение паренхимы печени, соответствующее высокой гистологической активности гепатита (стадия 3 по шкале METAVIR-A), с преобладанием белковой и/или жировой дистрофии гепатоцитов и формированием центролобулярных очагов коагуляционного некроза (рисунок 3, В).

Функциональная проба Квика – Пытеля, основанная на образовании ГК из бензоата и глицина в печени, имеет долгую историю валидации и использования в клинической практике, характеризуется вы-

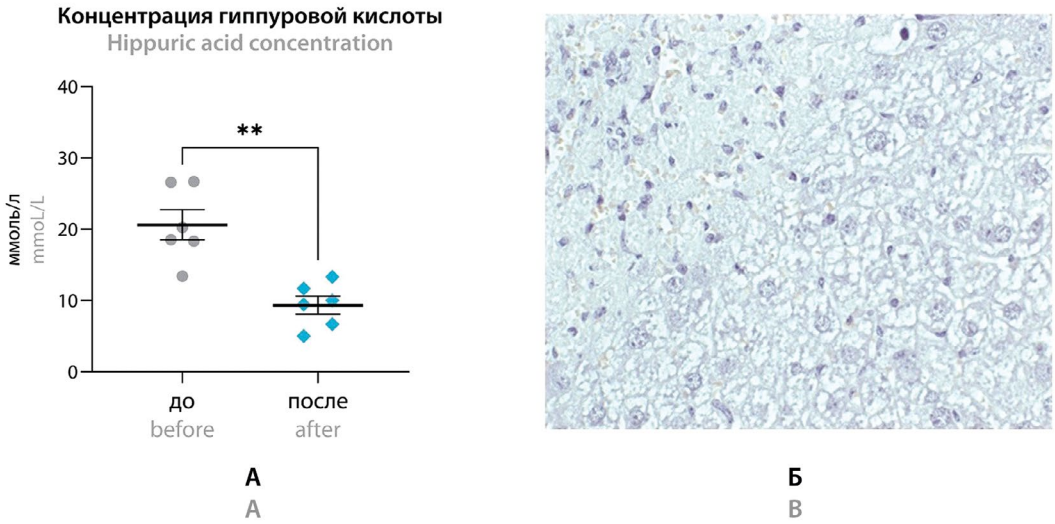


Рисунок 3. Оценка функции печени у выживших животных

А – концентрация гиппуровой кислоты (ГК) в моче мышей до и после индукции токсического гепатита. ** $p < 0{,}01$. В – морфологическая картина острого гепатита после введения тетрахлорметана. Гематоксилин и эозин, ×400

Figure 3. Liver function assessment in surviving animals

A – hippuric acid (HA) concentration in mouse urine before and after the induction of toxic hepatitis. ** $p < 0.01$. B – liver morphology after toxic hepatitis induction by carbon tetrachloride. Haematoxylin & eosin, ×400

сокой точностью, стабильностью и надежностью [5, 6]. Бензойная кислота и ее соли содержатся в организме в незначительных количествах. Поступающий извне натрия бензоат, помимо детоксификации в печени, метаболизируется кишечным микробиомом, что может оказывать дополнительное влияние на его биодоступность при пероральном приеме [7]. Вариант пробы Квика – Пытеля с внутривенным введением натрия бензоата, использовавшийся ранее с диагностической целью [6], в настоящее время не применяется, однако для лабораторных грызунов парентеральное введение соединения обеспечивает бóльшую точность дозирования и является предпочтительным.

Глицин синтезируется в печени из серина путем глицинсинтазной реакции со скоростью 12–15 мг/кг/ч [8]. Сокращение числа функционально активных клеток печени приводит к снижению системных уровней глицина [9], что также может влиять на результаты пробы. Установлено, что скорость-лимитирующим фактором биосинтеза ГК является именно наличие свободного глицина [2]. Таким образом, вне зависимости от уровня бензойной кислоты в организме в случае отсутствия экзогенного поступления глицина клиренс ГК является относительно постоянной величиной и для человека в норме составляет порядка 0,35 г/л, или порядка 2 ммоль/л [10]. У мышей дикого типа концентрация ГК в моче находится в диапазоне 5–15 --ммоль/л [11].

Уменьшение уровня выделяемой с мочой ГК указывает на нарушение ее образования в печени вследствие снижения ее функционального резерва. В настоящей работе мы наблюдали значительное уменьшение концентраций ГК в моче у мышей после интоксикации гепатотропным ядом тетрахлорметаном. Вызываемый им острый гепатит характеризуется развитием некроза, белковой и жировой дистрофии гепатоцитов, локализованных преимущественно в центральной зоне печеночной дольки, где максимальна активность зависимых от цитохрома Р450 монооксигеназ и преобладает продукция повреждающих метаболитов токсиканта [12].

Повышенное выделение с мочой ГК может отмечаться при употреблении преимущественно растительной пищи, богатой бензойной кислотой или ее предшественниками [13]. В соответствии с этим не следует использовать пробу Квика – Пытеля у мышей, получающих препараты, представляющие собой соли или эфиры бензойной кислоты (например, алоглиптина, амлодипина, ризатриптана бензоаты), а также продукты, содержащие натрия бензоат в качестве консерванта, без соответствующего контроля. Биологическими прекурсорами глицина являются серин, треонин, бетаин (триметилглицин), диметилглицин, холин, глутамин, глутамат, глиоксилат [14–16]. Остаток глицина содержат препараты теофиллина натрия глицинат и тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат; предшественниками глицина могут являться холина фенофибрат и холина альфосцерат. Аланин, цистеин, лейцин, норлейцин, изовалин, аспарагиновая и гликолевая кислоты, гликольальдегид, глюкоза, мочевина, натрия ацетат не влияют на биосинтез глицина у кроликов [17]. Помимо бензойной кислоты, в реакцию конъюгации с глицином способны напрямую или после биотрансформации вступать салициловая (в том числе образующаяся из ацетилсалициловой), гентизиновая, коричная, изовалериановая кислоты [18], фенилпропионовая кислота и природные полифенолы [19], толуол [20].

Поскольку клиренс гиппуровой кислоты практически на 100 % осуществляется почками, интерпретация результатов пробы Квика – Пытеля у мышей с нарушениями функции почек может быть затруднительна. Кроме этого, имеются данные, что в почках протекает и некоторая доля биосинтеза ГК [21]. Повышение концентраций ГК в моче наблюдается при хронической болезни почек и уремическом синдроме, снижение – при ожирении, болезни Крона, шизофрении, фенилкетонурии, раке легких, толстой кишки и мочевого пузыря [22]. В связи с вышесказанным в клинической лабораторной диагностике практикуется поправка уровня гиппуровой кислоты в моче на уровень креатинина с выражением результата в ммоль/моль или г/г креатинина. Референтный уровень определен как 0,18 г/г креатинина для взрослых. У женщин и людей старшего возраста концентрации гиппуровой кислоты в моче выше, чем у мужчин и молодых людей [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптированная в проведенном исследовании для скрининговой оценки антитоксической функции печени у лабораторных мышей проба Квика – Пытеля косвенно отражает количество функционально активных гепатоцитов, будучи простой в исполнении и не требующей значительных расходов. Однако при использовании пробы необходимо учитывать функцию почек и наличие некоторых других патологических состояний у экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулин И. Г., Медведев Ю. В. 13С-метацетиновый дыхательный тест при оценке функционального резерва печени. *Фарматека.* 2016;(S5):71–80.
2. Quick A. J., Cooper M. A. The synthesis of hippuric acid: a new test of liver function. *The American Journal of the Medical Sciences.* 1933;185:630–635. DOI: 10.1097/00000441-193305000-00004.
3. Пытель А. Я. Функциональная проба печени Квика в клинике хирургических заболеваний. *Клиническая медицина.* 1945;23(4–5):42.
4. Huang H.-L., Wang Y.-J., Zhang Q.-Y., Liu B., Wang F.-Y., Li J.-J., Zhu R.-Z. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl_4-induced acute liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology.* 2012;18(45):6605–6613. DOI: 10.3748/wjg.v18.i45.6605.

5. Snell A. M., Plunkett J. E. The hippuric acid test for hepatic function; its relation to other tests in general use. *American Journal of Digestive Diseases and Nutrition.* 1935;(2):716–721. DOI: 10.1007/BF03002434.
6. Meneghello J., Drinberg M. Intravenous hippuric acid test of hepatic function in infectious diseases of children. *American Journal of Diseases of Children.* 1943;66(2):103–113. DOI: 10.1001/archpedi.1943.02010200003001.
7. Yadav M., Lomash A., Kapoor S., Pandey R., Singh Chauhan N. Mapping of the benzoate metabolism by human gut microbiome indicates food-derived metagenome evolution. *Scientific Reports.* 2021;11(1):5561. DOI: 10.1038/s41598-021-84964-6.
8. Aguayo-Cerón K. A., Sánchez-Muñoz F., Gutierrez-Rojas R. A., Acevedo-Villavicencio L. N., Flores-Zarate A. V., Huang F., Giacoman-Martinez A., Villafaña S., Romero-Nava R. Glycine: The Smallest Anti-Inflammatory Micronutrient. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(14):11236. DOI: 10.3390/ijms241411236.
9. Rom O., Liu Y., Liu Z., Zhao Y., Wu J., Ghrayeb A., Villacorta L., Fan Y., Chang L., Wang L., Liu C., Yang D., Song J., Rech J. C., Guo Y., Wang H., Zhao G., Liang W., Koike Y., Lu H., Koike T., Hayek T., Pennathur S., Xi C., Wen B., Sun D., Garcia-Barrio M. T., Aviram M., Gottlieb E., Mor I., Liu W., Zhang J., Chen Y. E. Glycine-based treatment ameliorates NAFLD by modulating fatty acid oxidation, glutathione synthesis, and the gut microbiome. *Science Translational Medicine.* 2020;12(572):eaaz2841. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaz2841.
10. Ikeda M., Ohtsuji H. Significance of urinary hippuric acid determination as an index of toluene exposure. *British Journal of Industrial Medicine.* 1969;26(3):244–246. DOI: 10.1136/oem.26.3.244.
11. Pruss K. M., Chen H., Liu Y., Van Treuren W., Higginbottom S. K., Jarman J. B., Fischer C. R., Mak J., Wong B., Cowan T. M., Fischbach M. A., Sonnenburg J. L., Dodd D. Host-microbe co-metabolism via MCAD generates circulating metabolites including hippuric acid. *Nature Communications.* 2023;14(1):512. DOI: 10.1038/s41467-023-36138-3.
12. Скуратов А. Г. Тетрахлорметановая модель гепатита и цирроза печени у крыс. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2012;(9):37–40.
13. Beyoğlu D., Idle J. R. The glycine deportation system and its pharmacological consequences. *Pharmacology & Therapeutics.* 2012;135(2):151–167. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.05.003.
14. Qureshi I. A., Clermont P., Letarte J. The importance of glyoxylate and other glycine precursors in the hepatic and renal conjugation of benzoate in normal and hyperammonemic mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 1989;67(11):1426–1430. DOI: 10.1139/y89-228.
15. Siegert W., Ahmadi H., Helmbrecht A., Rodehutscord M. A quantitative study of the interactive effects of glycine and serine with threonine and choline on growth performance in broilers. *Poultry Science.* 2015;94(7):1557–1568. DOI: 10.3382/ps/pev109.
16. Alves A., Bassot A., Bulteau A.-L., Pirola L., Morio B. Glycine Metabolism and Its Alterations in Obesity and Metabolic Diseases. *Nutrients.* 2019;11(6):1356. DOI: 10.3390/nu11061356.
17. Griffith W. H., Lewis H. B. Studies in the synthesis of hippuric acid in the animal organism: V. The influence of amino-acids and related substances on the synthesis and rate of elimination of hippuric acid after the administration of benzoate. *Journal of Biological Chemistry.* 1923;57(1):1–24. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)85523-5.
18. Leung K.-Y., De Castro S. C. P., Santos C., Savery D., Prunty H., Gold-Diaz D., Bennett S., Heales S., Copp A. J., Greene N. D. E. Regulation of glycine metabolism by the glycine cleavage system and conjugation pathway in mouse models of non-ketotic hyperglycinemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2020;43(6):1186–1198. DOI: 10.1002/jimd.12295.
19. Badenhorst C. P. S., Erasmus E., van der Sluis R., Nortje C., van Dijk A. A. A new perspective on the importance of glycine conjugation in the metabolism of aromatic acids. *Drug Metabolism Reviews.* 2014;46(3):343–361. DOI: 10.3109/03602532.2014.908903.
20. Siqueira M. E., Paiva M. J. N. Hippuric acid in urine: reference values. *Revista de Saude Publica.* 2002;36(6):723–727. DOI: 10.1590/s0034-89102002000700010.
21. Beyoğlu D., Smith R. L., Idle J. R. Dog bites man or man bites dog? The enigma of the amino acid conjugations. *Biochemical Pharmacology.* 2012;83(10):1331–1339. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.12.031.
22. Bhattacharyya D., LeVatte M. A., Wishart D. S. A fast and accurate colorimetric assay for quantifying hippuric acid in human urine. *Analytical Biochemistry.* 2023;680:115303. DOI: 10.1016/j.ab.2023.115303.

REFERENCES

1. Bakulin I. G., Medvedev Yu. V. 13C-methacetin breath test in assessing the functional reserve of the liver. *Farmateka.* 2016;(S5):71–80. (In Russ.)
2. Quick A. J., Cooper M. A. The synthesis of hippuric acid: a new test of liver function. *The American Journal of the Medical Sciences.* 1933;185:630–635. DOI: 10.1097/00000441-193305000-00004.
3. Pytel' A. Ya. Quick's liver function test in the clinic of surgical diseases. *Klinicheskaya medicina.* 1945;23(4–5):42. (In Russ.)
4. Huang H.-L., Wang Y.-J., Zhang Q.-Y., Liu B., Wang F.-Y., Li J.-J., Zhu R.-Z. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl_4-induced acute liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology.* 2012;18(45):6605–6613. DOI: 10.3748/wjg.v18.i45.6605.
5. Snell A. M., Plunkett J. E. The hippuric acid test for hepatic function; its relation to other tests in general use. *American Journal of Digestive Diseases and Nutrition.* 1935;(2):716–721. DOI: 10.1007/BF03002434.
6. Meneghello J., Drinberg M. Intravenous hippuric acid test of hepatic function in infectious diseases of children. *American Journal of Diseases of Children.* 1943;66(2):103–113. DOI: 10.1001/archpedi.1943.02010200003001.
7. Yadav M., Lomash A., Kapoor S., Pandey R., Singh Chauhan N. Mapping of the benzoate metabolism by human gut microbiome indicates food-derived metagenome evolution. *Scientific Reports.* 2021;11(1):5561. DOI: 10.1038/s41598-021-84964-6.
8. Aguayo-Cerón K. A., Sánchez-Muñoz F., Gutierrez-Rojas R. A., Acevedo-Villavicencio L. N., Flores-Zarate A. V., Huang F., Giacoman-Martinez A., Villafaña S., Romero-Nava R. Glycine: The Smallest Anti-Inflammatory Micronutrient. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(14):11236. DOI: 10.3390/ijms241411236.
9. Rom O., Liu Y., Liu Z., Zhao Y., Wu J., Ghrayeb A., Villacorta L., Fan Y., Chang L., Wang L., Liu C., Yang D., Song J., Rech J. C., Guo Y., Wang H., Zhao G., Liang W., Koike Y., Lu H., Koike T., Hayek T., Pennathur S., Xi C., Wen B.,

Sun D., Garcia-Barrio M. T., Aviram M., Gottlieb E., Mor I., Liu W., Zhang J., Chen Y. E. Glycine-based treatment ameliorates NAFLD by modulating fatty acid oxidation, glutathione synthesis, and the gut microbiome. *Science Translational Medicine*. 2020;12(572):eaaz2841. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaz2841.

10. Ikeda M., Ohtsuji H. Significance of urinary hippuric acid determination as an index of toluene exposure. *British Journal of Industrial Medicine*. 1969;26(3):244–246. DOI: 10.1136/oem.26.3.244.
11. Pruss K. M., Chen H., Liu Y., Van Treuren W., Higginbottom S. K., Jarman J. B., Fischer C. R., Mak J., Wong B., Cowan T. M., Fischbach M. A., Sonnenburg J. L., Dodd D. Host-microbe co-metabolism via MCAD generates circulating metabolites including hippuric acid. *Nature Communications*. 2023;14(1):512. DOI: 10.1038/s41467-023-36138-3.
12. Skuratov A. G. Carbon tetrachloride model of hepatitis and liver cirrhosis in rats. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2012;(9):37–40. (In Russ.)
13. Beyoğlu D., Idle J. R. The glycine deportation system and its pharmacological consequences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;135(2):151–167. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.05.003.
14. Qureshi I. A., Clermont P., Letarte J. The importance of glyoxylate and other glycine precursors in the hepatic and renal conjugation of benzoate in normal and hyperammonemic mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1989;67(11):1426–1430. DOI: 10.1139/y89-228.
15. Siegert W., Ahmadi H., Helmbrecht A., Rodehutscord M. A quantitative study of the interactive effects of glycine and serine with threonine and choline on growth performance in broilers. *Poultry Science*. 2015;94(7):1557–1568. DOI: 10.3382/ps/pev109.
16. Alves A., Bassot A., Bulteau A.-L., Pirola L., Morio B. Glycine Metabolism and Its Alterations in Obesity and Metabolic Diseases. *Nutrients*. 2019;11(6):1356. DOI: 10.3390/nu11061356.
17. Griffith W. H., Lewis H. B. Studies in the synthesis of hippuric acid in the animal organism: V. The influence of amino-acids and related substances on the synthesis and rate of elimination of hippuric acid after the administration of benzoate. *Journal of Biological Chemistry*. 1923;57(1):1–24. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)85523-5.
18. Leung K.-Y., De Castro S. C. P., Santos C., Savery D., Prunty H., Gold-Diaz D., Bennett S., Heales S., Copp A. J., Greene N. D. E. Regulation of glycine metabolism by the glycine cleavage system and conjugation pathway in mouse models of non-ketotic hyperglycinemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2020;43(6):1186–1198. DOI: 10.1002/jimd.12295.
19. Badenhorst C. P. S., Erasmus E., van der Sluis R., Nortje C., van Dijk A. A. A new perspective on the importance of glycine conjugation in the metabolism of aromatic acids. *Drug Metabolism Reviews*. 2014;46(3):343–361. DOI: 10.3109/03602532.2014.908903.
20. Siqueira M. E., Paiva M. J. N. Hippuric acid in urine: reference values. *Revista de Saude Publica*. 2002;36(6):723–727. DOI: 10.1590/s0034-89102002000700010.
21. Beyoğlu D., Smith R. L., Idle J. R. Dog bites man or man bites dog? The enigma of the amino acid conjugations. *Biochemical Pharmacology*. 2012;83(10):1331–1339. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.12.031.
22. Bhattacharyya D., LeVatte M. A., Wishart D. S. A fast and accurate colorimetric assay for quantifying hippuric acid in human urine. *Analytical Biochemistry*. 2023;680:115303. DOI: 10.1016/j.ab.2023.115303.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.038

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2187

Check for updates

CC BY 4.0

Симуляция фармакокинетических параметров препарата тиозонид у пациентов с дефицитом веса на основе популяционной фармакокинетической модели

А. Ю. Савченко[1, 2]✉, В. Д. Васюков[2], В. С. Арнаутов[2, 3], Н. В. Шилова[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). 143442, Россия, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые Горы, владение 1

[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ **Контактное лицо:** Савченко Алла Юрьевна. **E-mail:** alursav@mail.ru

ORCID: А. Ю. Савченко – https://orcid.org/0000-0003-2734-5036;
В. Д. Васюков – https://orcid.org/0009-0001-4544-1825;
В. С. Арнаутов – https://orcid.org/0000-0003-3554-8941;
Н. В. Шилова – https://orcid.org/0000-0001-6734-0147.

Статья поступила: 24.09.2025 **Статья принята в печать:** 25.12.2025 **Статья опубликована:** 26.12.2025

Резюме

Введение. Пациенты с диагнозом туберкулеза легких с множественной (МЛУ-ТБ) или широкой лекарственной устойчивостью возбудителя (ШЛУ-ТБ) отличаются сниженной массой тела, что при стандартном режиме дозирования противотуберкулезных препаратов может приводить к изменению фармакокинетических параметров лекарственных средств, увеличивая риск возникновения нежелательных побочных реакций или снижения терапевтической эффективности. В связи с этим актуальной задачей является математическое моделирование влияния массы тела на фармакокинетику нового отечественного препарата тиозонид для обоснования оптимальных режимов дозирования.

Цель. Разработка математической модели влияния массы тела на фармакокинетические показатели препарата тиозонид и моделирование влияния массы тела пациентов на режим дозирования.

Материалы и методы. Для моделирования использовалась программная среда Julia и пакет Pumas.jl. Разработана двухкомпартментная фармакокинетическая модель с кинетикой первого порядка и абсорбцией, модифицированной при помощи функции Вейбулла. Для каждого сценария были взяты группы пациентов с различной фиксированной массой тела (40, 50, 60, 70 и 80 кг) и было выполнено 10 000 симуляций.

Результаты и обсуждение. Анализ результатов симуляций показал, что максимальная концентрация препарата (C_{max}) увеличивается при снижении массы тела, однако максимальное относительное различие между крайними группами (40 и 80 кг) составило 17,08 %. Минимальные концентрации (C_{tau}) были стабильны во всех группах, демонстрируя относительные изменения менее 2,5 %. Площадь под кривой «концентрация – время» (AUC_{tau}) варьировалась от 2,88 до 7,23 %.

Заключение. Разработана математическая модель влияния массы тела на фармакокинетические параметры нового отечественного препарата тиозонид. Проведенное исследование установило отсутствие необходимости изменения режима дозирования тиозонида у пациентов с массой тела от 40 до 80 кг.

Ключевые слова: тиозонид, популяционная фармакокинетика, фармакокинетика, оптимизация режима дозирования, туберкулез

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

Вклад авторов. А. Ю. Савченко – постановка цели и задачи исследование, формулирование концепции исследования, подготовка данных, обсуждение результатов, редактирование текста статьи. В. Д. Васюков, В. С. Арнаутов – планирование исследования, подготовка данных, построение модели, проведение симуляций, написание текста статьи. Н. В. Шилова – работа с литературными источниками, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

© Савченко А. Ю., Васюков В. Д., Арнаутов В. С., Шилова Н. В., 2026
© Savchenko A. Yu., Vasyukov V. D., Arnautov V. S., Shilova N. V., 2026

Для цитирования: Савченко А. Ю., Васюков В. Д., Арнаутов В. С., Шилова Н. В. Симуляция фармакокинетических параметров препарата тиозонид у пациентов с дефицитом веса на основе популяционной фармакокинетической модели. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):210–219. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2187

Simulation of pharmacokinetic parameters of thiozonide in patients with low body weight based on a population pharmacokinetic model

Alla Yu. Savchenko[1, 2]✉, Vladislav D. Vasyukov[2], Vladimir S. Arnautov[2, 3], Natalia V. Shilova[2]

[1] Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical-Biological Agency. estate 1, settlement Svetlye Gory, Krasnogorsk district, Moscow region, 143442, Russia
[2] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russia
[3] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba. 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Alla Yu. Savchenko. **E-mail:** alursav@mail.ru

ORCID: Alla Yu. Savchenko – https://orcid.org/0000-0003-2734-5036;
Vladislav D. Vasyukov – https://orcid.org/0009-0001-4544-1825;
Vladimir S. Arnautov – https://orcid.org/0000-0003-3554-8941;
Natalia V. Shilova – https://orcid.org/0000-0001-6734-0147.

Received: 24.09.2025 **Accepted:** 25.12.2025 **Published:** 26.12.2025

Abstract

Introduction. Patients diagnosed with pulmonary tuberculosis with multidrug-resistant or extensively drug-resistant pathogens (MDR-/XDR-TB) are characterized by reduced body weight (1, 2, 3). Under standard dosing regimens of antitubercular drugs, this can lead to altered pharmacokinetic parameters, increasing the risk of adverse reactions or reduced therapeutic efficacy. Therefore, mathematical modeling of the effect of body weight on the pharmacokinetics of the new domestic drug thiozonide is relevant for substantiating optimal dosing regimens.

Aim. To develop a mathematical model for assessing the influence of body weight on the pharmacokinetic parameters of thiozonide and to analyze the modeling results for individualized dosing approaches.

Materials and methods. The Julia programming environment and the Pumas.jl package were used for modeling. A two-compartment pharmacokinetic model with first-order kinetics and absorption, modified by the Weibull function, was developed. For each scenario, groups of patients with different fixed body weights (40, 50, 60, 70, and 80 kg) were considered, and 10 000 simulations were performed.

Results and discussion. Analysis of the simulation results showed that the maximum drug concentration (C_{max}) increased as body weight decreased; however, the maximum relative difference between the extreme groups (40 and 80 kg) was 17,08 %. Minimum concentrations (C_{tau}) remained stable across all groups, showing relative changes of less than 2,5 %. The area under the concentration-time curve (AUC_{tau}) varied from 2,88 to 7,23 %.

Conclusion. The study confirmed that there is no need to adjust the dosing regimen of thiozonide for patients weighing 40 to 80 kg.

Keywords: thiozonide, population pharmacokinetics, pharmacokinetics, dosing regimen optimization, tuberculosis

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. Alla Yu. Savchenko – defining research objective and goals, conceptualizing the study, data preparation, discussing results, editing the manuscript. Vladislav D. Vasyukov, Vladimir.S. Arnautov – study planning, data preparation, model development, simulations, manuscript writing. Natalia V. Shilova – reviewing the literature, discussing results, manuscript editing.

For citation: Savchenko A. Yu., Vasyukov V. D., Arnautov V. S., Shilova N. V. Simulation of pharmacokinetic parameters of thiozonide in patients with low body weight based on a population pharmacokinetic model. *Drug development & registration*. 2026;15(1):210–219. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2187

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важных целей современной фармакотерапии заболеваний – формирование индивидуального подхода к лечению, в том числе и в вопросах дозирования препаратов [1]. В терапии тяжелых и/или хронических заболеваний, таких как туберкулез, особенно важен индивидуальный подбор дозировки, поскольку таким образом можно снизить риск развития нежелательных явлений (НЯ) при длительном курсе лечения, каковым отличаются схемы терапии МЛУ-ТБ и ШЛУ-ТБ [2]. Одним из очевидных маркеров индивидуального состояния пациента является оценка массы его тела в целях использования для корректного дозирования лекарств [3], что актуально для пациентов с МЛУ-/ШЛУ-ТБ, характерной чертой которых является сниженная масса тела, особенно при наличии коморбидных состояний [4, 5]. У пациентов с низкой массой тела часто отмечается повышенная системная экспозиция лекарственных средств при стандартном режиме дозирования, рассчитанном на среднестатистическую массу. Показано, что пациенты с туберкулезом и сниженной массой тела получают повышенную дозу рифампицина, что сопровождается усилением выраженности побочных эффектов и токсичности терапии [6]. Избыточная концентрация в плазме может приводить к нежелательным побочным эффектам, в то время как недостаточная концентрация у пациентов может снизить терапевтическую эффективность лекарственного средства. В этой связи была поставлена задача «смоделировать влияние массы тела пациентов на фармакокинетические параметры нового отечественного противотуберкулезного препарата тиозонид».

Целью исследования стала разработка математической модели влияния массы тела на фармакокинетические показатели нового отечественного препарата тиозонид и анализ результатов моделирования индивидуализированного подхода к режиму дозирования. На основании популяционного фармакокинетического моделирования тиозонида возможно установить необходимую дозировку препарата для пациентов с дефицитом массы тела (≈50 кг и меньше) и при необходимости скорректировать схему лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Программное обеспечение и характеристики устройства

Для проведения популяционного моделирования была использована рабочая станция на базе процессора AMD Ryzen 9 5950X 16-Core, 3.40 GHz (Advanced Micro Devices, Inc., Малайзия), 64GB RAM Kingston 4X16GB DDR4-3200 ECC 9965745-026.A00G (Kingston, Тайвань) под управлением операционной системы Windows 10 Pro (версия 22H2, сборка ОС 19045.4651; Microsoft Corporation, США). Моделирование выполнялось в среде вычислений Julia (версия 1.8.5; разработчики: Jeff Bezanson, Stefan Karpinski, Viral B. Shah и JuliaData contributors) [7] с использованием пакета Pumas.jl (1.1) [8]; NCA-анализ симуляций выполнялся с использованием пакета MetidaNCA.jl (версия 6.3) [9]; также для работы с данными, графикой и другими задачами использовались пакеты: CSV.jl (версия 0.7.10; JuliaData contributors), DataFrames.jl (версия 0.21.8; JuliaData contributors), Plots.jl (версия 1.38.12; JuliaData contributors), Random.jl (версия 1.8.5; JuliaData contributors), StatsBase.jl (версия 0.33.21; JuliaData contributors), DataStructures.jl (версия 0.18.22; JuliaData contributors), в том числе стандартные пакеты, входящие в состав Julia 1.8 (LinearAlgebra.jl, версия 1.8.5, и др. соответствующие версии Julia; JuliaData contributors).

Структура базовой модели

Разработанная фармакокинетическая модель имеет двухкомпартментную структуру с первым порядком кинетики и с абсорбцией, модифицированной при помощи функции Вейбулла. Модель учитывает случайные эффекты (η) для трех параметров: объем распределения центрального компартмента (V_c), общий клиренс (*CL*), межкомпартментный клиренс (*Q*) и вариабельность параметров функции Вейбулла. В качестве ковариат были выбраны: масса тела (WGT); пол (SEX); общий белок (TP); тип субъекта (доброволец или пациент; STUDY).

На этапе подготовки к симуляции из исходных данных были сформированы пять групп пациентов, каждая по 10 000 субъектов, с фиксированными средними массами тела 40, 50, 60, 70 и 80 кг. Для проведения симуляций использовали эпидемиологическое соотношение заболеваемости в зависимости от пола 2:1 [10] и усредненный по выборке показатель общего белка 73 г/л. В качестве дозы при симуляции использовалась однократная пероральная доза 400 мг в день, которая соответствует применяемой дозировке во время клинических испытаний.

Ниже представлено математическое описание фармакокинетической модели:

$$\begin{cases} \frac{\partial Depot}{t} = -Ka \cdot W \cdot Depot, \\ \frac{\partial Central}{t} = Ka \cdot W \cdot Depot - \frac{(CL+Q)}{V_c} \cdot Central + \frac{Q}{V_p} \cdot Peripherial, \\ \frac{\partial Peripherial}{t} = \frac{Q}{V_c} \cdot Central - \frac{Q}{V_p} \cdot Peripherial, \end{cases}$$

где *Depot* – лекарственная форма; *Central* – центральный объем; *Peripherial* – периферийный объем; *Ka* – константа всасывания; *W* – кумулятивная функция распределения Вейбулла с параметрами λ (коэффициент масштаба), *k* (коэффициент формы); *CL* – общий клиренс; V_c – объем распределения; *Q* – межкомпартментный клиренс.

Модель случайных эффектов

$$\theta_i = \theta_p \exp(\eta),$$

$$\theta_{wi} = \theta_{wp} \exp(\eta_w),$$

где $\eta \sim MuNormal\ (0, \Omega)$, $\eta_w \sim MuNormal\ \theta_i$ – индивидуальные параметры; θ_p – популяционные параметры; θ_{wi} – индивидуальные параметры для модификатора абсорбции; θ_{wp} – популяционные параметры для модификатора абсорбции.

Модель остаточной вариации (residual error)

Была выбрана пропорциональная модель остаточной вариации:

$$DV \sim Normal\ (conc, conc \cdot \sigma_1),$$

где *DV* – зависимая переменная (измеренная концентрация); $conc = \frac{Central}{V_c}$ – модельное значение концентрации; σ_1 – мультипликативный компонент (таблица 1).

Фармакокинетические параметры рассчитывались по нижепредставленным формулам, приведенных в таблице 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 1–5 представлены усредненные фармакокинетические профили для групп субъектов с массами тела 40, 50, 60, 70 и 80 кг соответственно. В таблице 3 представлены полученные средние значения исследованных фармакокинетических параметров.

По результатам расчета данных клинического исследования II фазы среднее арифметическое Ctau для однократной дозировки 400 мг составило 1354,70 нг/мл (SD_{400} = 895,91; SD – стандартное отклонение), а для дозировки 600 мг составило 1729,68 нг/мл (SD_{600} = 827,47).

Таблица 1. Параметры популяционной фармакокинетической модели

Table 1. Parameters of the population pharmacokinetic model

Параметр Parameter	**Описание** Description	**Оценка** Assessment
θ_1	Объем распределения (V_c) Volume of distribution (V_c)	0,1444
θ_2	Клиренс общий (*CL*) Total clearance (*CL*)	0,0151
θ_3	Константа абсорбции (*Ka*) Absorption rate constant (*Ka*)	1,5480
θ_4	Периферийный объем распределения (V_p) Peripheral volume of distribution (V_p)	0,7627
θ_5	Межкомпартментный клиренс (*Q*) Inter-compartmental clearance (*Q*)	0,0113
λ (θ)	Коэффициент масштаба Scaling coefficient	1,7474
k (α)	Коэффициент формы Shape coefficient	3,9999
V_c_WGT	Ковариата: вес для объема распределения (V_c) Covariate: weight for volume of distribution (V_c)	0,4024
V_c_TP	Ковариата: общий белок для объема распределения (V_c) Covariate: total protein for volume of distribution (V_c)	–0,7790
V_c_SEX	Ковариата: пол для объема распределения (V_c) Covariate: sex for volume of distribution (V_c)	0,4863
*CL*_WGT	Ковариата: вес для общего клиренса (*CL*) Covariate: weight for total clearance (*CL*)	0,1110
*CL*_TP	Ковариата: общий белок для общего клиренса (*CL*) Covariate: total protein for total clearance (*CL*)	0,1005
*CL*_SEX	Ковариата: пол для общего клиренса (*CL*) Covariate: sex for total clearance (*CL*)	0,1102
*CL*_STUDY	Ковариата: доброволец / пациент для общего клиренса (*CL*) Covariate: volunteer/patient for total clearance (*CL*)	–0,6082

Окончание таблицы 1

Параметр Parameter	**Описание** Description	**Оценка** Assessment
Ω	Матрица случайных эффектов фармакокинетических параметров Matrix of random effects for pharmacokinetic parameters	$\begin{pmatrix} 0{,}3168 & \cdot & \cdot \\ 0{,}1076 & 0{,}2055 & \cdot \\ 0{,}2708 & 0{,}2028 & 0{,}6875 \end{pmatrix}$
Ω_w	Матрица случайных эффектов параметров функции Вейбулла Matrix of random effects for Weibull function parameters	$\begin{pmatrix} 0{,}7817 & \cdot \\ -0{,}6146 & 0{,}6522 \end{pmatrix}$
σ²_prop	Пропорциональная вариация Proportional variation	0,2274

Примечание. $\Omega_{1,1}$ – случайный эффект объема распределения (V_c); $\Omega_{2,2}$ – случайный эффект общего клиренса (CL); $\Omega_{3,3}$ – периферийный объем распределения (Q); Ω_{ij} – ковариация i и j случайных эффектов ($i \neq j$), где i – индекс строки вариационно-ковариационной матрицы, j – индекс столбца вариационно-ковариационной матрицы.

$\Omega_{w_{11}}$ – случайный эффект коэффициента формы (k); $\Omega_{w_{22}}$ – случайный эффект коэффициента масштаба (λ), $\Omega_{w_{ij}}$ – ковариация i и j случайных эффектов ($i \neq j$).

Note. $\Omega_{1,1}$ – random effect of volume of distribution (V_c); $\Omega_{2,2}$ – random effect of total clearance (CL); $\Omega_{3,3}$ – random effect of peripheral volume of distribution (Q); Ω_{ij} – covariance between the i and j random effects ($i \neq j$), where i – row index of the variation-covariance matrix, j – column index of the variation-covariance matrix.

$\Omega_{w_{11}}$ – random effect of the shape coefficient (k), $\Omega_{w_{22}}$ – random effect of the scale coefficient (λ), $\Omega_{w_{ij}}$ – covariance between the i and j random effects ($i \neq j$).

Таблица 2. Формулы расчета фармакокинетических параметров

Table 2. Equations for calculation of pharmacokinetic parameters

Средняя концентрация в плазме за интервал дозирования Mean plasma concentration over dosing interval	$C_{avg} = AUC_t/\tau$ где τ – интервал дозирования where τ – dosing interval
Площадь под кривой «концентрация – время» за интервал τ Area under the concentration-time curve over an interval τ	$AUC_{tau} = \sum_{ldt}^{\tau} AUC$ где ldt – время последнего дозирования (last dose time) where ldt – last dose time $AUC\|_{t_1}^{t_2} = \Delta t \cdot \frac{C_1 + C_2}{2}$ где Δt – время между временными точками t_2 и t_1 where Δt – time between time points t_2 and t_1
Период полувыведения Half-life	$t_{1/2} = \ln(2)/\lambda_z$ где λ_z – константа элиминации where λ_z – elimination constant
Индекс накопления Accumulation index	$Acc_{ind} = \frac{1}{1 - \exp(-\lambda_z \tau)}$
Индекс флуктуации Fluctuation index	$Fluc = (C_{max} - C_{\tau\,min})/C_{avg} \cdot 100\ (\%)$

Проведенные симуляции позволили детально оценить влияние массы тела на ключевые фармакокинетические параметры тиозонида. Максимальная концентрация препарата (C_{max}) увеличивалась пропорционально снижению массы тела, демонстрируя наибольшее относительное различие (17,08 %) между группами 40 и 80 кг. Различие 20 % применяется в качестве границы критерия сравнения препаратов. Используя данный подход, резонно отметить, что наблюдаемый уровень относительного различия

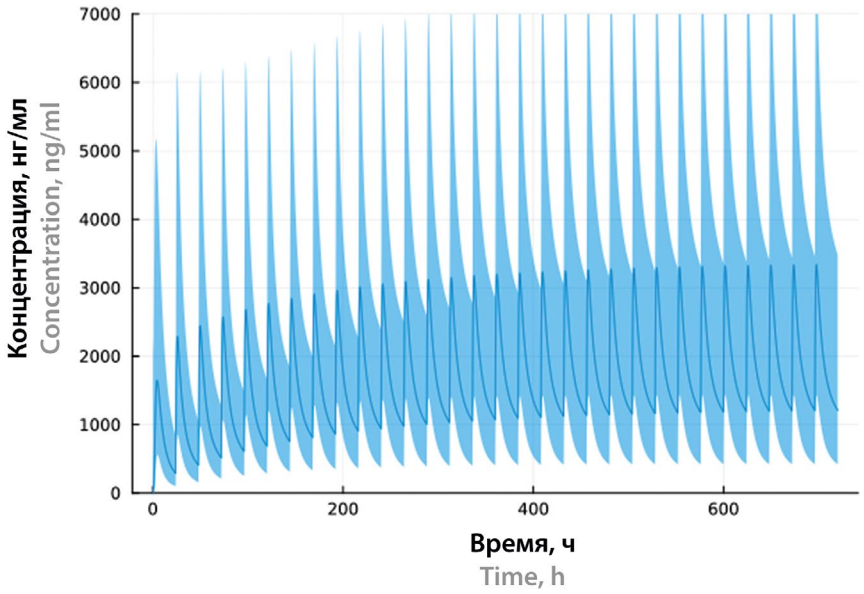


Рисунок 1. Усредненный фармакокинетический профиль сгенерированных субъектов (40 кг) при однократном приеме 400 мг тиозонида в день в период до 720 часов (с указанием 95%-х доверительных интервалов)

Figure 1. Mean pharmacokinetic profile of simulated subjects (40 kg) after a single 400 mg daily dose of thiozonide over a period of up to 720 hours (with 95 % confidence intervals indicated)

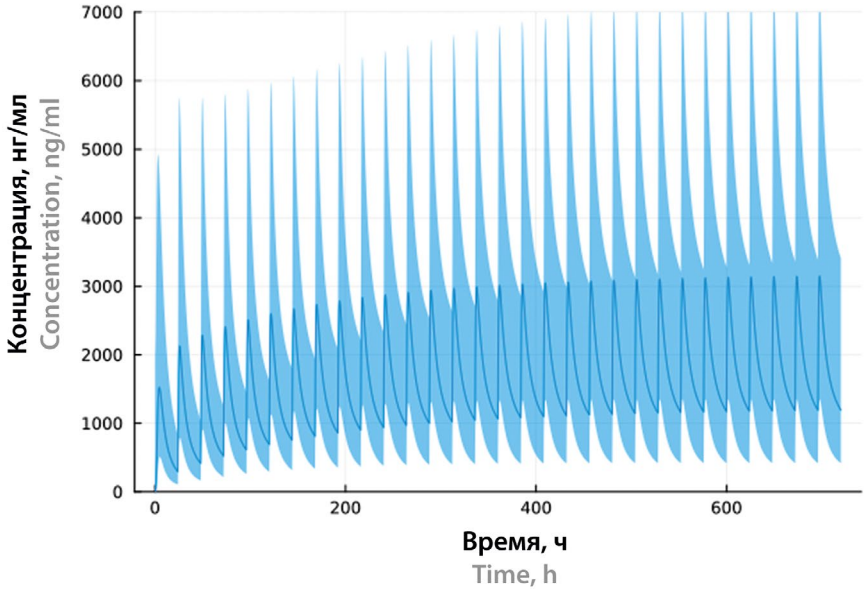


Рисунок 2. Усредненный фармакокинетический профиль сгенерированных субъектов (50 кг) при однократном приеме 400 мг тиозонида в день в период до 720 часов (с указанием 95%-х доверительных интервалов)

Figure 2. Mean pharmacokinetic profile of simulated subjects (50 kg) after a single 400 mg daily dose of thiozonide over a period of up to 720 hours (with 95 % confidence intervals indicated)

между крайними группами пациентов, стратифицированных по массе тела, находится в указанных пределах. Таким образом, не ожидается значимых различий клинического эффекта препарата без корректировки его дозы.

По результатам симуляций полученные значения C_{tau} соответствуют наблюдаемым в клиническом исследовании II фазы. При этом при анализе 95%-х доверительных интервалов средних геометрических значений C_{tau} были получены значения в преде-

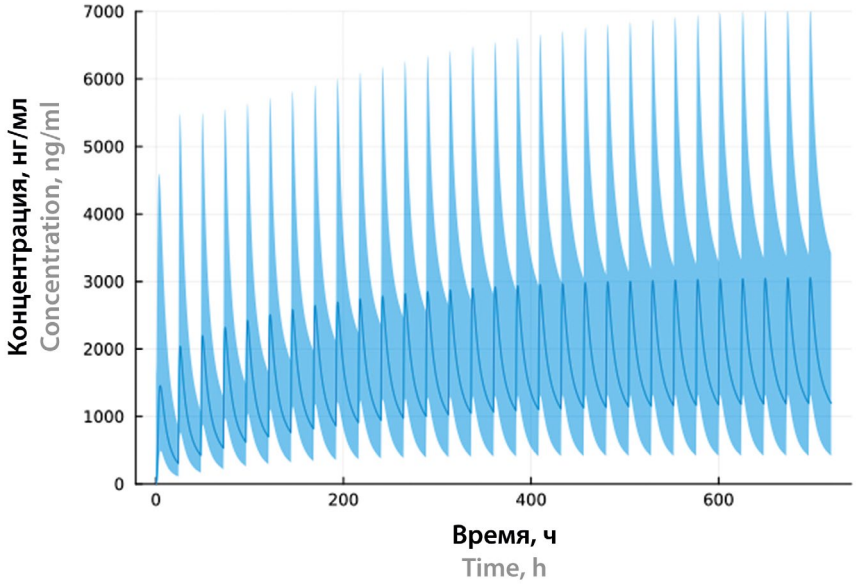


Рисунок 3. **Усредненный фармакокинетический профиль сгенерированных субъектов (60 кг) при однократном приеме 400 мг тиозонида в день в период до 720 часов (с указанием 95%-х доверительных интервалов)**

Figure 3. **Mean pharmacokinetic profile of simulated subjects (60 kg) after a single 400 mg daily dose of thiozonide over a period of up to 720 hours (with 95 % confidence intervals indicated)**

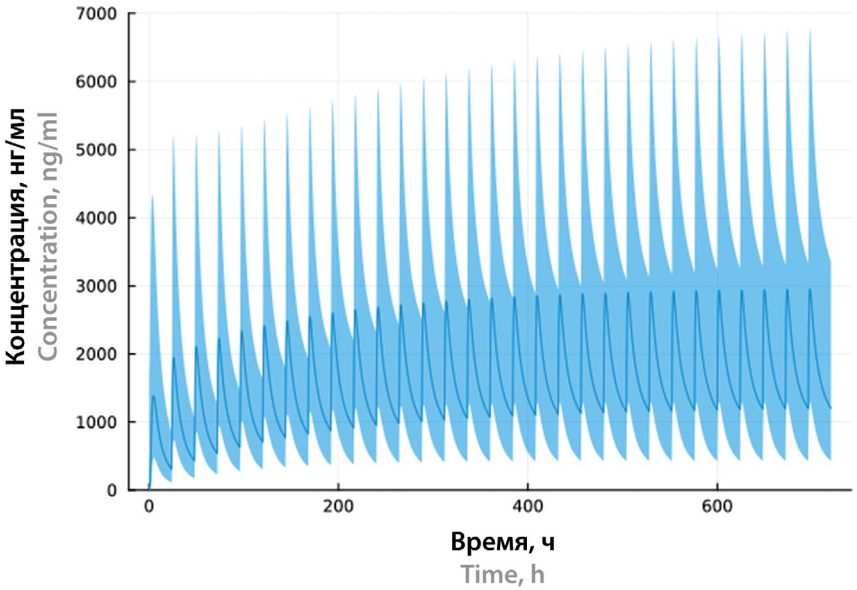


Рисунок 4. **Усредненный фармакокинетический профиль сгенерированных субъектов (70 кг) при однократном приеме 400 мг тиозонида в день в период до 720 часов (с указанием 95%-х доверительных интервалов)**

Figure 4. **Mean pharmacokinetic profile of simulated subjects (70 kg) after a single 400 mg daily dose of thiozonide over a period of up to 720 hours (with 95 % confidence intervals indicated)**

лах [99,71; 102,73] для пары весовых групп 40–50 кг и [100,93; 103,96] для пары 40–80 кг, что с учетом допустимых 20%-х различий означает практическое отсутствие влияния массы тела на параметр C_{tau}. Следовательно, это свидетельствует о способности препарата поддерживать стабильный терапевтический уровень даже при значительных колебаниях массы тела.

Показатель AUC_{tau}, отражающий общую экспозицию препарата, изменялся незначительно, достигая максимального различия в 7,23 % между крайними

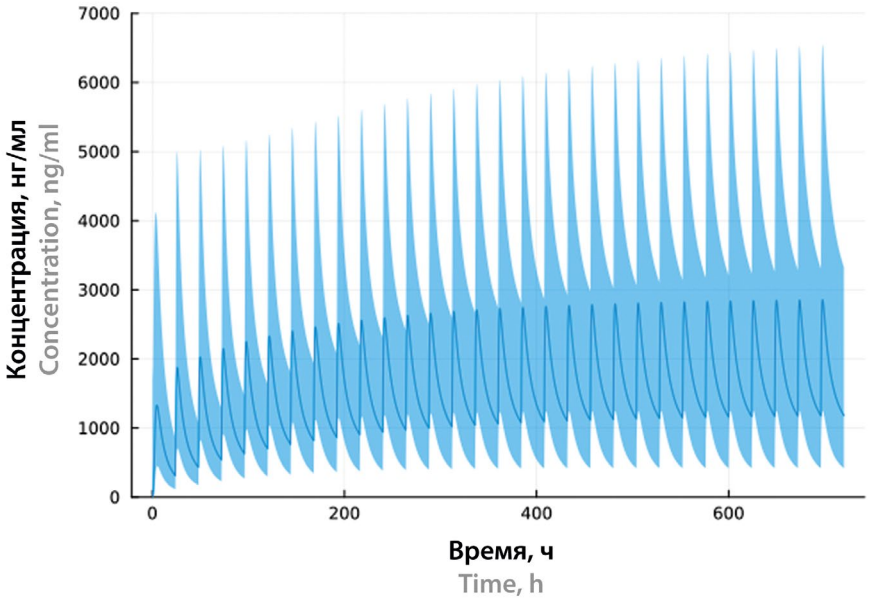


Рисунок 5. Усредненный фармакокинетический профиль сгенерированных субъектов (80 кг) при однократном приеме 400 мг тиозонида в день в период до 720 часов (с указанием 95%-х доверительных интервалов)

Figure 5. Mean pharmacokinetic profile of simulated subjects (80 kg) after a single 400 mg daily dose of thiozonide over a period of up to 720 hours (with 95 % confidence intervals indicated)

Таблица 3. Усредненные показатели симулированных внемодельных фармакокинетических параметров тиозонида при однократном приеме 400 мг в день в период до 720 часов

Table 3. Mean values of simulated out-of-model pharmacokinetic parameters of thiozonide after a single 400 mg dose over a period up to 720 hours

Параметр Parameter	Группы, кг Groups, kg				
	40	**50**	**60**	**70**	**80**
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	3357,17	3164,65	3067,68	2964,41	2867,33
C_{tau}, нг/мл C_{tau}, ng/mL	1210,32	1195,88	1197,67	1200,21	1181,58
C_{avg}, нг/мл C_{avg}, ng/mL	1948,86	1894,30	1878,49	1854,18	1817,45
AUC_{tau}, нг · ч/мл AUC_{tau}, ng · h/mL	46772,54	45463,28	45083,77	44500,30	43618,77
t_{max}, ч t_{max}, h	1,81	1,85	1,87	1,90	1,92
$t_{½}$, ч $t_{½}$, h	44,29	42,63	41,60	41,25	40,33
Acc_{ind}	3,26	3,16	3,10	3,08	3,02
Fluc, %	100,27	94,29	89,98	85,92	83,40

весовыми группами. Это подтверждает, что общий уровень экспозиции препарата остается стабильным и не требует коррекции дозы.

Анализ таблицы 4, отражающей отношения значений фармакокинетических параметров между группами пациентов различных весовых категорий, показал умеренные изменения параметров C_{max}, C_{tau} и AUC_{tau}. Наиболее выраженные изменения были отмечены по параметру C_{max} (до 17,08 % между крайними группами), тогда как изменения C_{tau} были минималь-

Таблица 4. Отношение значений (%) и 95%-е доверительные интервалы (нижняя и верхняя границы) основных фармакокинетических параметров

Table 4. Ratios (%) and 95% confidence intervals (lower and upper bounds) of the main pharmacokinetic parameters

C_{max}	**40 кг** 40 kg	**50 кг** 50 kg	**60 кг** 60 kg	**70 кг** 70 kg	**80 кг** 80 kg
40 кг 40 kg	–	106,08 [104,82; 107,36]	109,44 [108,14; 110,75]	113,25 [111,91; 114,6]	117,08 [115,7; 118,48]
50 кг 50 kg	–	–	103,16 [101,93; 104,4]	106,75 [105,49; 108,03]	110,37 [109,07; 111,69]
60 кг 60 kg	–	–	–	103,48 [102,27; 104,72]	106,99 [105,73; 108,26]
70 кг 70 kg	–	–	–	–	103,39 [102,18; 104,61]
80 кг 80 kg	–	–	–	–	–
C_{tau}	**40 кг** 40 kg	**50 кг** 50 kg	**60 кг** 60 kg	**70 кг** 70 kg	**80 кг** 80 kg
40 кг 40 kg	–	101,21 [99,71; 102,73]	101,06 [99,56; 102,57]	100,84 [99,37; 102,34]	102,43 [100,93; 103,96]
50 кг 50 kg	–	–	99,85 [98,38; 101,34]	99,64 [98,19; 101,11]	101,21 [99,73; 102,71]
60 кг 60 kg	–	–	–	99,79 [98,33; 101,27]	101,36 [99,88; 102,87]
70 кг 70 kg	–	–	–	–	101,58 [100,11; 103,07]
80 кг 80 kg	–	–	–	–	–
AUC_{tau}	**40 кг** 40 kg	**50 кг** 50 kg	**60 кг** 60 kg	**70 кг** 70 kg	**80 кг** 80 kg
40 кг 40 kg	–	102,88 [101,65; 104,12]	103,75 [102,51; 105,0]	105,11 [103,86; 106,37]	107,23 [105,95; 108,52]
50 кг 50 kg	–	–	100,84 [99,63; 102,06]	102,16 [100,95; 103,39]	104,23 [102,99; 105,49]
60 кг 60 kg	–	–	–	101,31 [100,11; 102,53]	103,36 [102,13; 104,61]
70 кг 70 kg	–	–	–	–	102,02 [100,81; 103,24]
80 кг 80 kg	–	–	–	–	–

ными (до 2,43 % между группами 40 и 80 кг). Параметр AUC_{tau} демонстрировал промежуточные различия (до 7,23 % между группами 40 и 80 кг). Представленные данные подтверждают отсутствие необходимости изменения дозы для пациентов с дефицитом массы тела.

При сравнении результатов симуляций с клинической группой субъектов, принимавших однократно 600 мг тиозонида в день, рассчитанные в ходе симуляции средние значения концентраций C_{tau} не превышали наблюдаемых по результатам расчета данных клинического исследования II фазы (1729,68 нг/мл). То есть при применении тиозонида в дозировке 400 мг у пациентов с дефицитом массы тела концентрации не превышают среднего уровня концентраций у субъектов, принимавших препарат в дозе 600 мг. Таким образом, можно предположить, что для пациентов с низкой массой тела профиль безопасности существенно не изменяется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ позволил оценить необходимость изменения режима дозирования для пациентов с дефицитом массы тела. Для пациентов с массой тела менее 50 кг корректировка дозы не требуется и предполагается, что профиль безопасности препарата не изменяется ввиду отсутствия наблюдаемых значимых различий между фармакокинетическими параметрами. Результаты настоящего исследования соответствуют дан-

ным клинических исследований, согласно которым применение дозы тиозонида 400 мг обеспечивает эффективные и безопасные концентрации у пациентов с широким диапазоном массы тела [11, 12].

ЛИТЕРАТУРА

1. LLerena A., Peñas-LLedó E., de Andrés F., Mata-Martín C., Sánchez C. L., Pijierro A., Cobaleda J. Clinical implementation of pharmacogenetics and personalized drug prescription based on e-health: the MedeA initiative. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2020;35(3):20200143. DOI: 10.1515/dmpt-2020-0143.
2. Thu V. T. A., Dat L.D., Jayanti R. P., Trinh H. K. T., Hung T. M., Cho Y.-S., Long N. P., Shin J.-G. Advancing personalized medicine for tuberculosis through the application of immune profiling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13:1108155. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1108155.
3. Cattermole G. N., Wells M. Comparison of adult weight estimation methods for use during emergency medical care. *JACEP Open*. 2021;2(4):e12515. DOI: 10.1002/emp2.12515.
4. Мамедсахатова С. Ч., Курбанмурадова Д. К. Гигиеническая оценка пищевого статуса больных с множественным лекарственным устойчивым туберкулезом легких. *Международный журнал гуманитарных и естественных наук*. 2024;10–4(97):7–12. DOI: 10.24412/2500-1000-2024-10-4-7-12.
5. Веселова Е. И., Кузнецова Е. Н., Перегудова А. Б., Тинькова В. В., Казюлина А. А., Васильева А. И. Генерализованный микобактериоз у больных ВИЧ-инфекцией. *Туберкулез и болезни легких*. 2024;102(5):50–57. DOI: 10.58838/2075-1230-2024-102-5-50-57.
6. Chiang C.-Y., Yu M.-C., Shih H.-C., Yen M.-Y., Hsu Y.-L., Yang S.-L., Lin T.-P., Bai K.-J. Improved consistency in dosing anti-tuberculosis drugs in Taipei, Taiwan. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e44133. DOI: 10.1371/journal.pone.0044133.
7. Bezanson J., Edelman A., Karpinski S., Shah V. B. Julia: A fresh approach to numerical computing. SIAM Review. 2017;59(1):65–98. DOI: 10.1137/141000671.
8. Rackauckas C., Ma Y., Noack A., Dixit V., Mogensen P. K., Elrod C., Tarek M., Byrne S., Maddhashiya S., Santiago Calderón J. B. Nyberg J., Gobburu J. V. C., Ivaturi V. Accelerated predictive healthcare analytics with pumas, a high performance pharmaceutical modeling and simulation platform. *BioRxiv*. 2020;11. DOI: 10.1101/2020.11.28.402297.
9. Arnautov V. S. PharmCat/MetidaNCA.jl: (v0.7.1). Zenodo. 2025. DOI: 10.5281/zenodo.15793888.
10. Mason P. H., Degeling C., Denholm J. Sociocultural dimensions of tuberculosis: an overview of key concepts. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2015;19(10):1135–1143. DOI: 10.5588/ijtld.15.0066.
11. Савченко А. Ю., Раменская Г. В., Буренков М. С. Изучение безопасности и переносимости противотуберкулезного препарата тиозонид при однократном приеме возрастающих доз. *Качественная клиническая практика*. 2016;3:43–48.
12. Савченко, А. Ю., Меньшикова, Л. А., Раменская, Г. В., Смолярчук Е. А. Фармакокинетическое исследование инновационного противотуберкулезного препарата тиозонида в плазме крови. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(3):3–6.

REFERENCES

1. LLerena A., Peñas-LLedó E., de Andrés F., Mata-Martín C., Sánchez C. L., Pijierro A., Cobaleda J. Clinical implementation of pharmacogenetics and personalized drug prescription based on e-health: the MedeA initiative. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2020;35(3):20200143. DOI: 10.1515/dmpt-2020-0143.
2. Thu V. T. A., Dat L.D., Jayanti R. P., Trinh H. K. T., Hung T. M., Cho Y.-S., Long N. P., Shin J.-G. Advancing personalized medicine for tuberculosis through the application of immune profiling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023;13:1108155. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1108155.
3. Cattermole G. N., Wells M. Comparison of adult weight estimation methods for use during emergency medical care. *JACEP Open*. 2021;2(4):e12515. DOI: 10.1002/emp2.12515.
4. Mamedsahatova S. Ch., Gurbanmyradova D. G. Hygienic assessment of nutritional status of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *International Journal of Humanities and Natural Sciences*. 2024;10–4(97):7–12. (In Russ.) DOI: 10.24412/2500-1000-2024-10-4-7-12.
5. Veselova E. I., Kuznetsova E. N., Peregudova A. B., Tinkova V. V., Kazyulina A. A., Vasilyeva I. A. Generalized Mycobacteriosis in HIV Patients. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2024;102(5):50–57. (In Russ.) DOI: 10.58838/2075-1230-2024-102-5-50-57.
6. Chiang C.-Y., Yu M.-C., Shih H.-C., Yen M.-Y., Hsu Y.-L., Yang S.-L., Lin T.-P., Bai K.-J. Improved consistency in dosing anti-tuberculosis drugs in Taipei, Taiwan. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e44133. DOI: 10.1371/journal.pone.0044133.
7. Bezanson J., Edelman A., Karpinski S., Shah V. B. Julia: A fresh approach to numerical computing. SIAM Review. 2017;59(1):65–98. DOI: 10.1137/141000671.
8. Rackauckas C., Ma Y., Noack A., Dixit V., Mogensen P. K., Elrod C., Tarek M., Byrne S., Maddhashiya S., Santiago Calderón J. B. Nyberg J., Gobburu J. V. C., Ivaturi V. Accelerated predictive healthcare analytics with pumas, a high performance pharmaceutical modeling and simulation platform. *BioRxiv*. 2020;11. DOI: 10.1101/2020.11.28.402297.
9. Arnautov V. S. PharmCat/MetidaNCA.jl: (v0.7.1). Zenodo. 2025. DOI: 10.5281/zenodo.15793888.
10. Mason P. H., Degeling C., Denholm J. Sociocultural dimensions of tuberculosis: an overview of key concepts. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2015;19(10):1135–1143. DOI: 10.5588/ijtld.15.0066.
11. Savchenko A. Y., Ramenskaya G. V., Bourenkov M. S. The safety and tolerability study of tiozonid in single dose with it increasing. *Good Clinical Practice*. 2016;3:43–48. (In Russ.)
12. Savchenko A. Yu., Menshikova L. A., Rameskaya G. V., Smolyarchuk E. A. Studying pharmacokinetics of new anti-tuberculosis drug thiozonide in blood plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(3):3–6.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.033

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2245

Check for updates

CC BY 4.0

Острая токсичность и фармакокинетические параметры 2-аминопиррола с противоопухолевой активностью

С. С. Зыкова✉, Ю. Н. Карпенко, С. В. Чащина, Н. М. Игидов, В. Г. Лужанин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России). 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

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

ORCID: С. С. Зыкова – https://orcid.org/0000-0002-7395-4951;
Ю. Н. Карпенко – https://orcid.org/0000-0003-3174-3678;
С. В. Чащина – https://orcid.org/0000-0003-4427-310X;
Н. М. Игидов – https://orcid.org/0000-0003-0976-9951;
В. Г. Лужанин – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027.

Статья поступила: 01.12.2025 **Статья принята в печать:** 25.12.2025 **Статья опубликована:** 26.12.2025

Резюме

Введение. Одним из актуальных направлений современной фармации является создание высокоэффективных и безопасных лекарственных средств. Поиск противоопухолевых средств в связи с ростом онкологических заболеваний направлен на получение таргетных препаратов. Синтезированные в Пермской государственной фармацевтической академии производные 2-аминопиррола продемонстрировали высокую цитостатическую активность, обусловленную активизацией механизма апоптоза опухолевых клеток в М-фазе. В объеме доклинических исследований необходимо оценить острую токсичность и определить фармакокинетические параметры наиболее активного соединения 2-АНПК.

Цель. Изучение острой токсичности в опытах на мышах и крысах и фармакокинетических параметров 2-АНПК после однократного введения крысам линии Wistar.

Материалы и методы. Оценка острой токсичности при пероральном введении с вычислением LD_{50} методом пробит-анализа данных Finney проведена в опытах на белых нелинейных мышах и крысах линии Wistar. Фармакокинетические параметры 2-АНПК исследованы на крысах-самцах линии Wistar после введения соединения *per os*. Для количественного определения 2-АНПК в плазме крови животных использована валидированная методика на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Результаты и обсуждение. LD_{50} соединения при однократном пероральном введении определена на уровне 4434 мг/кг для мышей и 1547 мг/кг для крыс. Время достижения максимальной концентрации 2-АНПК в организме крыс при однократном введении 150 мг/кг составляет 2,90 ± 0,32 ч, период полувыведения соединения из организма – 4,50 ± 0,49 ч. Расчетная величина кажущегося объема распределения, значительно превышающая анатомический объем, указывает на преимущественное локализацию вещества во внесосудистом пространстве.

Заключение. В ходе изучения острой токсичности на мышах установлено, что 2-АНПК относится к 4 классу токсичности (малотоксичные) по классификации Hodge и Sterner и 5 классу опасности химической продукции по воздействию на организм. В эксперименте на крысах проведена оценка фармакокинетических параметров 2-АНПК после перорального введения. Полученные данные показывают потенциальную возможность создания на основе нового производного 2-аминопиррола с доказанной противоопухолевой активностью лекарственной формы для перорального применения.

Ключевые слова: 2-аминопирролы, острая токсичность, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Н. М. Игидов занимался синтезом исследуемого вещества. С. С. Зыкова, С. В. Чащина проводили изучение острой токсичности, определение фармакокинетических параметров. Ю. Н. Карпенко проводила анализ образцов плазмы методом ВЭЖХ-МС/МС. В. Г. Лужанин – написание статьи.

© Зыкова С. С., Карпенко Ю. Н., Чащина С. В., Игидов Н. М., Лужанин В. Г., 2026
© Zykova S. S., Karpenko Yu. N., Chaschina S. V., Igidov N. M., Luzhanin V. G., 2026

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка таргетных драг-кандидатов с высокой цитотоксической и противоопухолевой активностью на основе 2-аминопирролов» ZUNI-2025-0004.

Для цитирования: Зыкова С. С., Карпенко Ю. Н., Чащина С. В., Игидов Н. М., Лужанин В. Г. Острая токсичность и фармакокинетические параметры 2-аминопиррола с противоопухолевой активностью. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):220–226. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2245

Acute toxicity and pharmacokinetic parameters of 2-aminopyrrole with antitumour activity

Svetlana S. Zykova✉, Yulia N. Karpenko, Svetlana V. Chaschina, Nazim M. Igidov, Vladimir G. Luzhanin

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

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

ORCID: Svetlana S. Zykova – https://orcid.org/0000-0002-7395-4951;
Yulia N. Karpenko – https://orcid.org/0000-0003-3174-3678;
Svetlana V. Chaschina – https://orcid.org/0000-0003-4427-310X;
Nazim M. Igidov – https://orcid.org/0000-0003-0976-9951;
Vladimir G. Luzhanin – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027.

Received: 01.12.2025 **Accepted:** 25.12.2025 **Published:** 26.12.2025

Abstract

Introduction. One of the most pressing areas of modern pharmacy is the creation of highly effective and safe drugs. The search for antitumor agents, driven by the increasing incidence of cancer, is focused on obtaining targeted drugs. 2-aminopyrrole derivatives synthesised at the Perm State Pharmaceutical Academy have demonstrated high cytostatic activity due to the activation of the mechanism of tumour cell apoptosis in the M phase. Preclinical studies should include toxicometry and determination of the pharmacokinetic parameters of the most active compound, 2-ANPC.

Aim. To study acute toxicity in experiments on mice and rats and the pharmacokinetic parameters of 2-ANPC after a single administration to Wistar line rats.

Materials and methods. The assessment of acute toxicity upon oral administration, with LD_{50} calculation using Finney's probit analysis method, was conducted in experiments on white non-linear mice and Wistar line rats. The pharmacokinetic parameters of 2-ANPC were studied in male Wistar line rats after administration of the compound *per os*. A validated method based on high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (HPLC-MS/MS) was used for the quantitative determination of 2-ANPC in the blood plasma of animals.

Results and discussion. The LD_{50} of the compound after a single oral administration was determined to be 4434 mg/kg for mice and 1547 mg/kg for rats. The time to reach the maximum concentration of 2-ANPC in rats after a single administration of 150 mg/kg is 2,90 ± 0,32 h, and the half-life of the compound from the body is 4,50 ± 0,49 h. The calculated apparent volume of distribution, which significantly exceeds the anatomical volume, indicates the predominant localisation of the substance in the extravascular space.

Conclusion. The study of acute toxicity in mice established that 2-ANPK belongs to toxicity class 4 (low-toxicity substances) according to the Hodge and Sterner classification and to hazard class 5 of chemical products based on their impact on the body. In an experiment on rats, the pharmacokinetic parameters of 2-ANPC after oral administration were evaluated. The data obtained show the potential for developing an oral dosage form based on this new 2-aminopyrrole derivative with proven antitumor activity.

Keywords: 2-aminopyrroles, acute toxicity, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Nazim M. Igidov was involved in the synthesis of the studied substance. Svetlana S. Zykova and Svetlana V. Chashchina conducted acute toxicity studies and determined pharmacokinetic parameters. Yulia N. Karpenko analysed plasma samples using HPLC-MS/MS. Vladimir G. Luzhanin writing an article.

Funding. This work was supported by the Russian Ministry of Health's state assignment "Development of targeted drug candidates with high cytotoxic and antitumor activity based on 2-aminopyrroles" (ZUNI-2025-0004).

For citation: Zykova S. S., Karpenko Yu. N., Chaschina S. V., Igidov N. M., Luzhanin V. G. Acute toxicity and pharmacokinetic parameters of 2-aminopyrrole with antitumour activity. *Drug development & registration*. 2026;15(1):220–226. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2245

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений современной фармации является создание высокоэффективных и безопасных лекарственных средств. Поиск противоопухолевых средств в связи с ростом онкологических заболеваний направлен на получение таргетных препаратов [1]. Синтезированные в Пермской государственной фармацевтической академии производные 2-аминопиррола продемонстрировали высокую цитостатическую активность, обусловленную активизацией механизма апоптоза опухолевых клеток в М-фазе [2]. Наиболее активным является соединение 2-амино-1-бензамидо-5-[2-(нафталин-2-ил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид (далее – 2-АНПК)[1] [3]. Этап доклинических исследований потенциального лекарственного средства предусматривает оценку токсикологических и фармакокинетических параметров.

Изучение острой токсичности с определением полулетальной дозы LD_{50} необходимо для определения терапевтической дозы для введения 2-АНПК *in vivo*.

Исследование фармакокинетики лекарственных препаратов является ключевым этапом изучения воздействия на организм *in vivo* и содержит информацию о клеточных механизмах взаимодействия на уровне мишеней, а также позволяет оценить риски развития органотоксичности.

Особую актуальность имеет изучение фармакокинетических параметров драг-кандидатов, которые позволяют разработать оптимальную лекарственную форму, максимально раскрывающую их терапевтический потенциал.

Цель. Изучение острой токсичности в опытах на мышах и крысах и фармакокинетических параметров 2-АНПК после однократного введения крысам линии Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились с разрешения этической комиссии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (протокол № 2 от 20.02.2025 г.). Содержание животных осуществлялось в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986)[2]. Животные находились на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде.

Исследование острой токсичности проведено на белых нелинейных мышах (самцах и самках) массой 19–23 г и крысах линии Wistar (самцах и самках) массой 180–210 г. Для исследования каждой дозы использовались группы по 6 животных одного пола. Соединение вводили в возрастающих дозах внутрижелудочно при помощи зонда. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток, регистрировали проявления интоксикации, летальность. Значение LD_{50} рассчитывали методом пробит-анализа данных Finney с использованием таблицы MS Excel.

Согласно общим рекомендациям по проведению доклинических исследований в качестве объектов для изучения фармакокинетики были выбраны крысы линии Wistar [4, 5]. Оценка фармакокинетических параметров 2-АНПК проводилась на крысах-самцах линии Wistar массой 200–230 г ($n = 10$) после введения соединения *per os*. Данный способ введения продиктован физико-химическими свойствами 2-АНПК (нерастворим в воде, спирте). Соединение вводили в виде взвеси в 1%-м растворе крахмала. Доза для крыс составила 150 мг/кг веса животного. Животные контрольной группы получали 1%-й раствор крахмала.

Соединение вводили в желудок бодрствующим животным натощак через зонд. Отбор проб крови у крыс проводили до введения соединения и спустя 20 мин, 40 мин, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 16 и 24 ч. Животных подвергали эвтаназии в CO_2-камере, образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отобранную плазму помещали в чистые пластиковые пробирки и хранили при температуре минус 70 °С до анализа.

Концентрацию 2-АНПК в плазме крови животных определяли методом ВЭЖХ-МС/МС на жидкостном хроматомасс-спектрометре LCMS-8050 (Shimadzu). Используемые в анализе органические растворители имели квалификацию «HPLC grade». Пробоподготовку образцов проводили путем преципитации белков плазмы раствором внутреннего стандарта (ацетонитрильный раствор аторвастатина с концентрацией 25 нг/мл) с последующим центрифугированием при 10 000 об/мин. 2 мкл супернатанта вводили в инжектор хроматографа. Условия ВЭЖХ-МС/МС-анализа включали разделение компонентов пробы на колонке Luna C18(2) 100 A, 150 × 3,0 мм, 3 мкм (Phenomenex), с использованием подвижной фазы состава 0,1%-й раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил (60:40). Детектирование осуществляли в

[1] Бойчук С. В., Зыкова С. С., Галембикова А. Р., Игидов Н. М., Сюзёв К. Н., Ганькова К. Л., Дунаев П. Д., Шустов М. В., Бикиниева Ф. Ф., Карпенко Ю. Н., Аухадиева А. М., Цечёев А. Т. 2-амино-1-бензамидо-5-[2-(нафталин-2-ил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид и 2-амино-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-1-[2-(фениламино)бензамидо]-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид, ингибирующие процесс полимеризации тубулина и обладающие цитотоксической и противоопухолевой активностями в отношении эпителиальных опухолей человека. Патент РФ на изобретение № 2777209. Заявл. 16.08.2021. Опубл. 01.08.2022.

[2] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207468/ Ссылка активна на 11.12.2025.

режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с применением положительной ионизации электроспреем. MRM-переход для 2-АНПК составил 427,00 → 410,00 m/z. Биоаналитическая методика была предварительно валидирована по основным показателям (селективность, линейность, правильность и прецизионность). Результаты валидации удовлетворяли установленным критериям приемлемости[1] [6, 7].

На основании полученных аналитических данных (концентрация *C*, нг/мл, – время *t*, ч) непараметрическим методом были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: значение максимальной концентрации (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), период полувыведения ($T_{1/2}$), среднее время пребывания в организме (MRT), константа элиминации (K_{el}), общий клиренс (Cl), объем распределения (*Vd*), интегральная площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» (area under curve, AUC).

Поскольку в эксперименте применяли дизайн «животное – точка», предусматривающий отбор крови после эвтаназии животного в определенный временной промежуток, расчет фармакокинетических параметров проводили двумя способами. В первом случае традиционно учитывали средние значения концентраций 2-АНПК для каждой временной точки. При использовании второго способа расчет осуществляли по индивидуальным фармакокинетическим профилям, условно считая животных с одинаковым порядковым номером «точками» одной кривой. Возможность использования такого подхода была показана в работе [8], в которой авторы при ретроспективной обработке данных ряда исследований получали сопоставимые результаты расчетов фармакокинетических параметров тремя способами: по средним значениям концентраций, по животным с одинаковыми порядковыми номерами и с применением ресемплинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После однократного перорального введения соединения мышам и крысам летальные эффекты фиксировали в течение первых двух суток. В течение трех последующих суток гибели животных не отмечалось, но общее состояние у некоторых животных оставалось неудовлетворительным в течение недели. В дальнейшем в течение всего срока наблюдения (14 дней) клиническое состояние животных полностью нормализовалось [9].

В первые сутки после введения препарата гибель животных отмечали при высоких дозах соединения (5000–5500 мг/кг массы тела для мышей и 2000–2500 мг/кг). Наблюдалось общетоксическое действие на организм животных: угнетение, вынужденное боковое положение.

Значение LD_{50} соединения при пероральном введении мышам составило 4434,02 ± 252,26 мг/кг, что дает основание отнести его к 4 классу токсичности (малотоксичные) по классификации Hodge и Sterner [10] и 5 классу опасности химической продукции по воздействию на организм в соответствии с ГОСТ 32419-2022[2].

Значение LD_{50} 2-АНПК при пероральном введении крысам определено на уровне 1546,84 ± 171,38 мг/кг. Соединение можно отнести к 4 классу токсичности (малотоксичные) по классификации Hodge и Sterner [10] и 5 классу опасности химической продукции по воздействию на организм в соответствии с ГОСТ 32419-2022 [11]. Для сравнения токсичность паклитаксела составляет на крысах 48 мг/кг, что свидетельствует о низкой токсичности 2-аминопирролов [12].

Исследование фармакокинетических параметров 2-АНПК в опытах на крысах проведено в дозе 150 мг/кг веса животного, равной 1/10 от LD_{50}. Концентрации 2-АНПК в плазме крови крыс после перорального введения и усредненный фармакокинетический профиль представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Рассчитанные фармакокинетические параметры 2-АНПК приведены в таблице 2.

Установлено, что расчеты фармакокинетических параметров, произведенные двумя способами, демонстрируют близкие результаты, что подтверждает корректность их использования.

Полученные данные свидетельствуют о быстрой абсорбции соединения из желудочно-кишечного тракта. После перорального введения 2-АНПК крысам вещество определяется в плазме крови уже через 20 мин в концентрации 41,74 ± 13,36) нг/мл. Максимальная концентрация (C_{max}) составляет 230,65 ± 62,99 и регистрируется в плазме крови через 2,90 ± 0,32 ч (T_{max}), а параметр, характеризующий скорость всасывания, $C_{max}/AUC_{0\to\infty}$, составляет 0,174 $ч^{-1}$.

Распределение препарата и степень его связывания в организме характеризуется величиной кажущегося объема распределения (*Vd*), который для соединения 2-АНПК составил 741,52 ± 107,03 л/кг после перорального введения крысам в дозе 150 мг/кг. Расчет величины *Vd* дал высокие значения, значительно превышающие анатомический объем, что указывает на преимущественную локализацию вещества во внесосудистом пространстве. На основании этого можно заключить, что 2-АНПК из сосудистого русла проникает в органы и ткани крыс.

[1] Руководство по валидации биоаналитических методов и изучение аналитических образцов / ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline. Ссылка активна на 11.11.2025.

[2] ГОСТ 32419-2022. Классификация опасности химической продукции. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200189295/ Ссылка активна на 11.11.2025.

Таблица 1. Концентрации 2-АНПК (нг/мл) в плазме крови крыс после однократного перорального введения

Table 1. Concentrations of 2-ANPC (ng/ml) in rat blood plasma after a single oral administration

Параметры Parameters	Время, ч Time, h										
N	0	0,33	0,67	1,00	2,00	3,00	4,00	6,00	12,00	16,00	24,00
1	0	25,19	84,52	106,44	116,03	187,14	111,03	76,34	32,02	10,16	12,44
2	0	47,13	48,20	154,69	161,27	269,74	186,58	60,24	21,1	26,7	7,25
3	0	40,23	68,11	88,12	74,52	107,64	105,84	95,82	42,82	19,08	4,19
4	0	55,4	55,12	90,47	152,65	301,29	202,57	58,64	18,66	12,35	14,57
5	0	51,15	91,78	114,65	227,85	229,41	116,47	48,29	28,49	29,58	6,78
6	0	48,86	86,87	101,43	174,76	275,42	170,31	70,41	16,21	12,71	3,49
7	0	15,92	102,10	166,29	205,51	179,65	99,23	55,65	12,58	15,34	8,96
8	0	57,30	74,51	99,57	119,32	215,71	186,07	90,57	37,44	19,22	5,94
9	0	33,68	52,08	111,22	166,84	320,1	134,81	51,33	18,36	22,6	10,99
10	0	42,55	70,45	82,99	110,45	194,56	155,97	88,20	39,9	16,88	6,68
Среднее Average	0	41,74	73,37	111,59	150,92	228,07	146,89	69,55	26,76	18,46	8,13
Среднее геометрическое Geometric mean	0	39,24	71,32	108,84	143,99	218,64	142,37	67,64	24,74	17,51	7,42
Медиана Median	0	44,84	72,48	103,93	156,96	222,56	145,39	65,33	24,80	17,98	7,02
Стандартное отклонение Standard deviation	0	13,36	18,04	27,79	46,57	64,64	38,23	17,35	10,83	6,33	3,58
Минимум Minimum	0	15,92	48,2	82,99	74,52	107,64	99,23	48,29	12,58	10,16	3,49
Максимум Maximum	0	57,3	102,1	166,29	227,85	320,1	202,57	95,82	42,82	29,58	14,57
CV, %	-	32,0	24,6	24,9	30,9	28,3	26,0	24,9	40,5	34,3	44,1

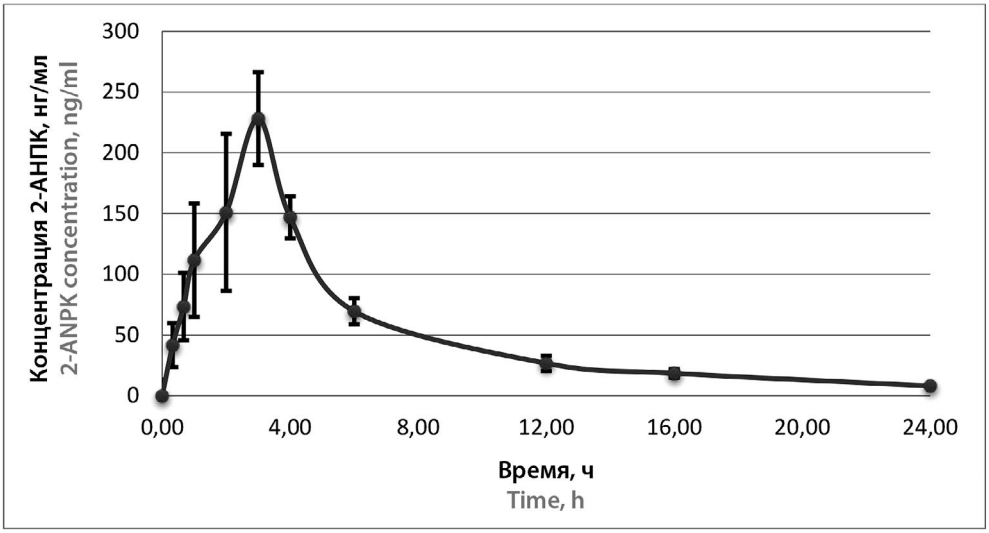


Рисунок 1. Фармакокинетический профиль 2-АНПК в плазме крови крыс после однократного перорального введения в дозе 150 мг/кг

Figure 1. Pharmacokinetic profile of 2-ANPC in rat blood plasma after a single oral administration at a dose of 150 mg/kg

Таблица 2. Фармакокинетические параметры 2-АНПК при однократном пероральном введении крысам ($\bar{X}$ ± SD)

Table 2. Pharmacokinetic parameters of 2-ANPC after a single oral administration to rats ($\bar{X}$ ± SD)

Параметры Parameters	Значение (1 способ) Meaning (method 1)	Значение (2 способ) Meaning (method 2)
AUC_{0-24}, нг/мл · ч AUC_{0-24}, ng/ml · h	1267,36	1267,36 ± 101,00
$AUC_{0-\infty}$, нг/мл · ч $AUC_{0-\infty}$, ng/ml · h	1320,79	1321,79 ± 99,11
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	228,07	230,65 ± 62,99
T_{max}, ч T_{max}, h	3,00	2,90 ± 0,32
$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	4,55	4,50 ± 0,49
MRT, ч MRT, h	6,15	6,15 ± 0,56
Vd, л/кг *Vd*, l/kg	746,40	741,52 ± 107,03
Cl, л/(кг · ч) Cl, l/(kg · h)	113,57	113,38 ± 8,55
K_{el}, $ч^{-1}$ K_{el}, h^{-1}	0,152155	0,15588 ± 0,01908

Такие фармакокинетические параметры, как среднее время удерживания вещества в организме (MRT – 6,15 ч) и общий плазменный клиренс (Cl – 113,38 ± 8,55 л/ч/кг), указывают на длительное нахождение исследуемого вещества в организме животных. Время полувыведения $T_{1/2}$ соединения из организма составляет в среднем 4,50 ± 0,49 ч. Соединение 2-АНПК определяется в плазме крови на протяжении 24 ч, при этом его концентрация составляет в конечной точке 8,13 ± 3,58 нг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что новое биологически активное производное 2-аминопиррола 2-АНПК с цитотоксическим действием при пероральном введении является малотоксичным и согласно ГОСТ 32419-2022 может быть отнесено к 4–5 классу опасности по воздействию на организм.

Исследования фармакокинетики 2-АНПК показали его быстрое всасывание из желудочно-кишечного тракта после перорального введения крысам. Максимальная концентрация соединения в плазме крови достигается через 2,90 ± 0,32 ч. Соединение проникает в органы и ткани животных и длительное время задерживается в организме.

Изучение фармакокинетического профиля соединения 2-АНПК показало потенциальную возможность создания на его основе лекарственной формы для перорального применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галембикова А. Р., Дунаев П. Д., Бикиниева Ф. Ф., Мустафин И. Г., Копнин П. Б., Зыкова С. С., Мухутдинова Ф. И., Сарбазян Е. А., Бойчук С. В. Механизмы цитотоксической активности пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью. *Успехи молекулярной онкологии*. 2023;10(3):59–71. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71.
2. Boichuk S., Galembikova A., Bikinieva F., Dunaev P., Aukhadieva A., Syuzov K., Zykova S., Igidov N., Ksenofontov A., Bocharov P. 2-APCAs, the Novel Microtubule Targeting Agents Active against Distinct Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2021;26(3):616. DOI: 10.3390/molecules26030616.
3. Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K., Dunaev P., 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.
4. Namdari R., Jones K., Chuang S. S., Van Cruchten S., Dincer Z., Downes N., Mikkelsen L. F., Harding J., Jäckel S., Jacobsen B., Kinyamu-Akunda J., Lortie A., Mhedhbi S., Mohr S., Schmitt M. W., Prior H. Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105029. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105029.
5. Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. Организация фармакокинетических исследований. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2021;3:12–19. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
6. Сюбаев Р. Д., Енгалычева Г. Н., Горячев Д. В., Соколов А. В., Чистяков В. В., Степанова Е. С. Экспертная оценка доклинических исследований токсикокинетики лекарственных средств (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(9):3–7.
7. Кривощеков С. В., Яновская Е. А., Гурто Р. В., Брюшинина О. С., Исаков Д. А., Зыкова А. В., Зюзькова Ю. Г., Гурьев А. М., Удут В. В., Белоусов М. В. Валидация биоаналитической методики определения и оценка фармакокинетики нового лекарственного средства на основе полисахарида аира болотного в эксперименте на лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):190–201. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1795.
8. Косман В. М., Карлина М. В., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Сопоставление приёмов расчета фармакокинетических параметров в исследованиях с дизайном «животное-точка». *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2023;3:19–27. DOI: 10.37489/2587-7836-2023-3-19-27.
9. Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2013. 944 с.
10. Измеров Н. Ф., Саноцкий И. В., Сидоров К. К. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии. М.: Медицина; 1977. 196 с.
11. Березовская И. В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003;37(3):32–34.
12. Boichuk S., Syuzov K., Bikinieva F., Galembikova A., Zykova S., Gankova K., Igidov S., Igidov N. Computatio-

nal-Based Discovery of the Anti-Cancer Activities of Pyrrole-Based Compounds Targeting the Colchicine-Binding Site of Tubulin. *Molecules*. 2022;27(9):2873. DOI: 10.3390/molecules27092873.

REFERENCES

1. Galembikova A. R., Dunaev P. D., Bikinieva F. F., Mustafin I. G., Kopnin P. B., Zykova S. S., Muhutdinova F. I., Sarbazyan E. A., Boichuk S. V. Mechanisms of cytotoxic activity of pyrrole-carboxamides against multidrug-resistant tumor cell sublines. *Advances in molecular oncology*. 2023;10(3):59–71. (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X-20231035971.
2. Boichuk S., Galembikova A., Bikinieva F., Dunaev P., Aukhadieva A., Syuzov K., Zykova S., Igidov N., Ksenofontov A., Bocharov P. 2-APCAs, the Novel Microtubule Targeting Agents Active against Distinct Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2021;26(3):616. DOI: 10.3390/molecules26030616.
3. Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K., Dunaev P., 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.
4. Namdari R., Jones K., Chuang S. S., Van Cruchten S., Dincer Z., Downes N., Mikkelsen L. F., Harding J., Jäckel S., Jacobsen B., Kinyamu-Akunda J., Lortie A., Mhedhbi S., Mohr S., Schmitt M. W., Prior H. Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105029. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105029.
5. Miroshnichenko I. I., Kravtsova O. Y. Organizing of pharmacokinetic investigations. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2021;(3):12–19. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
6. Syubaev R. D., Engalycheva G. N., Goryachev D. V., Sokolov A. V., Chistyakov V. V., Stepanova E. S. Expert evaluation of pre-clinical studies of the toxicokinetics of pharmaceuticals preparations (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(9):3–7. (In Russ.)
7. Krivoshchekov S. V., Yanovskaya E. A., Gurto R. V., Bryushinina O. S., Isakov D. A., Zykova A. V., Zyuz'kova Yu. G., Guryev A. M., Udut V. V., Belousov M. V. Pharmacokinetics of a new drug based on polysaccharide from acorus calamus in an experiment on laboratory animals. *Drug development & registration*. 2024;13(4):190–201. (In Russ.) DO: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1795.
8. Kosman V. M., Karlina M. V., Makarova M. N., Makarov V. G. Comparison of pharmacokinetic parameters calculation techniques in studies with animal-point design. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;3:19–27. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2023-3-19-27.
9. Mironov A. N., editor. Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Medicines. Moscow: Grif i K; 2013. 944 p. (In Russ.)
10. Izmerov N. F., Sanotsky I. V., Sidorov K. K. Toxicometric parameters of industrial poisons after a single exposure. Moscow: Medicine; 1977. 196 p. (In Russ.)
11. Berezovskaya I. V. Classification of chemical substances by parameters of acute toxicity for parenteral routes of administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003;37(3):32–34.
12. Boichuk S., Syuzov K., Bikinieva F., Galembikova A., Zykova S., Gankova K., Igidov S., Igidov N. Computational-Based Discovery of the Anti-Cancer Activities of Pyrrole-Based Compounds Targeting the Colchicine-Binding Site of Tubulin. *Molecules*. 2022;27(9):2873. DOI: 10.3390/molecules27092873.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.03

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2146

Check for updates

CC BY 4.0

Comparative Hepatoprotective Effects of Dapagliflozin to Silymarin Against Cyclophosphamide-Induced Liver Injury in Rats: Biochemical, Antioxidants and Histopathological Studies

Afrah Thiab Hlail[1]✉, Nada Naji Al-Shawi[2]

[1] University of Thi-Qar, College of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology. Thi-Qar, Iraq
[2] University of Baghdad, College of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology. Baghdad, Iraq

✉ **Corresponding author:** Afrah Thiab Hlail. **E-mail:** medicalresearch20@yahoo.com

ORCID: Afrah Thiab Hlail – https://orcid.org/0000-0001-9223-2850;
Nada Naji Al-Shawi – https://orcid.org/0000-0003-3657-1465.

Received: 14.07.2025 **Accepted:** 21.01.2026 **Published:** 23.01.2026

Abstract

Introduction. Hepatotoxicity is primarily-caused by oxidative stress and mitochondrial dysfunction; and, it is the principal factor that restricts the clinical efficacy of cyclophosphamide (Cpd), which is a chemotherapeutic drug that is frequently-used. The antioxidant capabilities have been demonstrated by dapagliflozin (Dapa), which is an inhibitor of sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT2). Silymarin (Sil) is a chemical that is extracted from milk thistle. Researches have demonstrated that silymarin has hepatoprotective and antioxidant properties.

Aim. This study aimed to compare the hepatoprotective effects of dapagliflozin to silymarin in a rat model of Cpd-induced liver injury.

Material and methods. Negative control, vehicle (2 % aqueous sodium carboxy methylcellulose CMC), Cpd (30 mg/kg/day, Intraperitoneal (ip), Dapa + Cpd (3 mg/kg/day, oral), and Sil + Cpd (200 mg/kg/day, oral) were the five groups that were randomly assigned to fifty rats. Each group consisted of ten rats. Following a period of ten days, evaluation the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum; while, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), and superoxide dismutase (SOD) enzyme were all measured in liver tissues; and histological inspection was also performed on the samples.

Results and discussion. Levels of ALT, AST, and MDA were each considerably-increased by Cpd, while the levels of GSH and SOD were decreased ($P < 0.05$). Treatment with either Dapa or Sil each with Cpd resulted in a significant amelioration of these alterations ($P < 0.05$ compared to controls). The results of the study demonstrate that Dapa was more effective than Sil in lowering MDA levels and increasing of GSH and SOD levels ($P < 0.05$). In the Dapa (Group IV), the histological examination revealed that the hepatic architecture had been intact, and there was only slight increase in vascular congestion.

Conclusion. Both dapagliflozin and silymarin each confer comparable hepatoprotective effects against Cpd-induced liver injury, possibly through attenuation of oxidative stress and preservation of hepatocyte integrity. The study adds to current evidence supporting the use of each of these agents in hepatic injury models. However, unlike the study of Satyam et al (2024) which investigated their combined effect, this study highlights their individual efficacy in a cyclophosphamide-specific toxicity model.

Keywords: cyclophosphamide, dapagliflozin, silymarin , 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. The research was conceptualized, designed, conducted and written in part by both writers.

Acknowledgment. To my supervisor and all of my teachers in the PhD study at the College of Pharmacy, Baghdad University.

For citation: Hlail A. T., Al-Shawi N. N. Comparative Hepatoprotective Effects of Dapagliflozin to Silymarin Against Cyclophosphamide-Induced Liver Injury in Rats: Biochemical, Antioxidants and Histopathological Studies. *Drug development & registration*. 2026;15(1):227–239. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2146

© Hlail A. T., Al-Shawi N. N., 2026
© Хлаил А. Т., Аль-Шави Н. Н., 2026

Сравнительное исследование гепатотропного действия дапаглифлозина и силимарина на модели циклофосфамид-индуцированного поражения печени у крыс

Афра Тиаб Хлаил[1]✉, Нада Наджи Аль-Шави[2]

[1] Университет Ти-Кар, фармацевтический факультет, кафедра фармакологии и токсикологии. Ти-Кар, Ирак
[2] Багдадский университет, фармацевтический факультет, кафедра фармакологии и токсикологии. Багдад, Ирак

✉ **Контактное лицо:** Афра Тиаб Хлаил. **E-mail:** medicalresearch20@yahoo.com

ORCID: Афра Тиаб Хлаил – https://orcid.org/0000-0001-9223-2850;
Нада Наджи Аль-Шави – https://orcid.org/0000-0003-3657-1465.

Статья поступила: 14.07.2025 **Статья принята в печать:** 21.01.2026 **Статья опубликована:** 23.01.2026

Резюме

Введение. Гепатотоксичность циклофосфамида в первую очередь обусловлена влиянием его метаболитов, в том числе акролеина. Антиоксидантные свойства были продемонстрированы дапаглифлозином (Dapa), ингибитором натрий-глюкозного котранспортера-2 (SGLT2). Силимарин (Sil) – это химическое вещество, извлекаемое из расторопши пятнистой. Исследования показали, что силимарин обладает гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами.

Цель. Целью данного исследования было сравнение гепатопротекторных эффектов дапаглифлозина и силимарина на модели поражения печени, вызванного ЦФД, у крыс.

Материалы и методы. В качестве отрицательного контроля использовались: растворитель (2%-й водный раствор карбоксиметилцеллюлозы натрия, КМЦ), циклофосфамид (30 мг/кг/день, внутрибрюшинно), дапаглифлозин + циклофосфамид (3 мг/кг/день, перорально) и силимарин + циклофосфамид (200 мг/кг/день, перорально). 50 крыс были случайно распределены на 5 групп по 10 животных в каждой. Через десять дней оценивали уровни аланин-аминотрансферазы (ALT) и аспартат-аминотрансферазы (AST) в сыворотке крови; в тканях печени измеряли уровни малонового диальдегида (MDA), восстановленного глутатиона (GSH) и супероксиддисмутазы (СОД); также проводили гистологическое исследование образцов.

Результаты и обсуждение. Уровни ALT, AST и MDA значительно повышались под действием циклофосфамида, в то время как уровни GSH и СОД снижались ($P < 0,05$). Лечение дапаглифлозином или силимарином на фоне применения ЦФД привело к значительному улучшению этих изменений ($P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). Результаты исследования показывают, что Dapa был более эффективен, чем Sil, в снижении уровня MDA и повышении уровня GSH и SOD ($P < 0,05$). В группе Dapa (группа IV) гистологическое исследование показало, что строение печени осталось неизменным, и наблюдалось лишь незначительное увеличение сосудистого застоя.

Заключение. И дапаглифлозин, и силимарин оказывают сопоставимое гепатопротекторное действие против вызванного циклофосфамидом поражения печени, возможно, за счет ослабления окислительного стресса и сохранения целостности гепатоцитов. Данное исследование дополняет имеющиеся данные, подтверждающие использование каждого из этих препаратов в моделях поражения печени. Однако, в отличие от исследования Сатьяма и др. (2024), в котором изучалось их комбинированное действие, данное исследование подчеркивает их индивидуальную эффективность в модели токсичности, специфичной для циклофосфамида.

Ключевые слова: циклофосфамид, дапаглифлозин, силимарин, окислительный стресс

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

Вклад авторов. Оба автора разработали, спланировали исследование и написали текст статьи.

Благодарность. Научному руководителю и всем преподавателям в рамках обучения в аспирантуре фармацевтического факультета Багдадского университета.

Для цитирования: Хлаил А. Т., Аль-Шави Н. Н. Сравнительное исследование гепатотропного действия дапаглифлозина и силимарина на модели циклофосфамид-индуцированного поражения печени у крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1):227–239. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2146

INTRODUCTION

Cyclophosphamide (Cpd), an oxazaphosphorine of nitrogen mustard derivative, is utilized in the treatment of various human cancers, including solid tumors, lymphomas, and leukemia [1]. It is also extensively-employed to manage non-neoplastic conditions such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus [2].

A limitation of Cpd in clinical settings is the risk of therapeutic doses causing liver damage; researchers indicate that alterations in cellular nucleic acids accompany oxidative stress (OS), which is commonly associated with Cpd-induced hepatotoxicity and may significantly contribute to its etiology [3]. This consequently disturbs the intracellular oxidant/antioxidant equilibrium in the liver by diminishing the functions of endogenous antioxidant proteins and enzymes (such as ALT and AST), resulting from Cpd's detrimental effects on the mitochondria and compromised cellular respiration [4, 5].

Dapagliflozin is the inaugural sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) inhibitor sanctioned by the EMA for the treatment of type 2 diabetes. It functions by inhibiting the kidneys' capacity to reabsorb filtered glucose, hence augmenting urine glucose excretion and reducing blood glucose levels. This medicine has obtained FDA approval for treating type 2 diabetes in adults, focusing on reducing blood glucose levels and minimizing the risk of heart failure hospitalization in individuals with type 2 diabetes with a history of cardiovascular disease (CVD) or other CVD risk factors, including smoking, hypertension, or dyslipidemia; and is intended to be used alongside a healthy lifestyle [6]. Dapagliflozin, has just been licensed as a potential preventive treatment against organ toxicity induced by radiation therapy, particularly in conjunction with doxorubicin and cisplatin. Dapagliflozin mitigated oxidative stress and apoptosis in diabetic rat models by inhibiting doxorubicin-induced apoptosis and the generation of reactive oxygen species (ROS), resulting in decreased heart fibrosis and enhanced cardiac function [7]. This effect is accompanied with the alleviation of oxidative stress pathways in the endoplasmic reticulum (ER). Dapagliflozin mitigated Electrocardiographic abnormalities and doxorubicin-induced reductions in ejection fraction in non-diabetic rats. Histopathological analyses indicated that those administered dapagliflozin exhibited reduced myocardial injury [8]. The expression of antioxidant enzymes was enhanced, while markers of heart hypertrophy and fibrosis were diminished following the stimulation of the PI3K/AKT/Nrf2 signaling pathway by dapagliflozin. The modulation contributes to its capacity to safeguard the heart. It exhibits hepatoprotective properties alongside its cardioprotective benefits [8, 9].

In addition it enhanced histological liver architecture and reduced elevated liver enzymes (ALT, AST) in Wistar rats following cisplatin treatment. The advantages of dapagliflozin and silymarin combination in rehabilitating liver function and architecture were noted. Dapagliflozin mitigated renal fibrosis, renal dysfunction, and glomerular shrinkage induced by doxorubicin, as indicated by research findings. It may be beneficial in preventing nephrotoxicity in patients treated with doxorubicin, as it diminished ROS production and apoptosis in renal tissues [10, 11].

Silymarin, a flavonolignan complex obtained from the seeds of Silybum marianum (milk thistle), has been thoroughly examined for its beneficial effects on liver health; Mutlu Deger et al. (2022) shown that Dapagliflozin safeguarded the kidneys of mice against cyclosporine A-induced nephrotoxicity [12]. The therapeutic potential and mechanisms of action against several hepatotoxins have been further investigated from 2022 to 2025 [13].

Silymarin demonstrates significant antioxidant properties by neutralizing reactive oxygen species (ROS) and preventing lipid peroxidation. Yang et al. (2022) and H. M. Jaffar et al.(2024) discovered that silymarin mitigated acetaminophen-induced hepatic injury by reducing glutathione levels and diminishing the synthesis of deleterious metabolites via the downregulation of CYP2E1 enzyme expression and activity [14,15].

The anti-inflammatory attributes of silymarin are realized through the suppression of NF-κB and the reduction of pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-6. El-Kot et al. (2023) shown that rats administered silymarin alongside CCl_4 exhibited markedly reduced inflammatory markers and improved liver histology [16].

Silymarin safeguards the hepatic tissue from oxidative stress-induced damage by regulating enzyme activity. It specifically augments the concentration of intrinsic antioxidant enzymes, including catalase and superoxide dismutase (SOD) [17]. Okiljević et al. (2024) report that administering silymarin to mice subjected to paracetamol-induced oxidative stress resulted in enhanced antioxidant enzyme activity and reduced liver damage [18].

Several hepato-toxins have been investigated concerning silymarin's putative protective properties; where, Silymarin can mitigate acetaminophen-induced hepatotoxicity by augmenting antioxidant defenses and inhibiting CYP2E1-mediated bioactivation. In carbon tetrachloride (CCl_4) liver injury models, it mitigates inflammation and oxidative stress, thereby enhancing liver function and histological outcomes [19].

Research conducted by B. Okiljević, et al (2024) indicated that silymarin exhibited hepatoprotective properties against acetaminophen-induced toxicity by reducing serum liver enzyme levels and enhancing liver histology in rats model [20].

Objectives of the Study

The purpose of this study was to compare dapagliflozin to silymarin in terms of its effect on oxidative stress parameters, serum enzyme levels (alanine and aspartate aminotransferases), and histological investigations in male rats against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

Approval Number: REC062463A was granted on 2-3-2024 by the Local Research Ethics Committee of the College of Pharmacy, University of Baghdad, Iraq, for the processes pertaining to animal care and research.

Materials

Carboxymethylcellulose sodium salt was acquired from HiMedia Laboratories Pvt. India, cyclophosphamide was obtained from Baxter, Germany, and dapagliflozin was sourced from Sigma company, USA. Silymarin was procured from MACKLIN Company, China. AST and ALT kits were acquired from LINEAR CHIMICALS, S.L.U. in Spain, while ELIS/A kits for GSH, SOD, and MDA were sourced from Elabscience in the USA.

Animals

Fifty (50) male Wistar albino rats, aged five to six-weeks-old, weighing 150–180 grams, were obtained from the University of Baghdad's local animal facility, which is part of the Department of Pharmacology and Toxicology. The standard laboratory lighting conditions of a 12:12 hour light: dark cycle and a temperature of 25 ± 2 °C were applied to all of the rats. One week before the trial started, all of the animals were acclimated. Each of the five groups consisted of ten rats, which were randomly assigned to the groups. Negative control: (I). Rats were administered distilled water (DW) orally and provided with a standard diet. (II). Rats were supplied a 2 % aqueous solution of sodium-carboxymethylcellulose (Na+-CMC) orally via gavage daily for 10 days, based on the weight of each animal [21]. (III). (Induction): Rats were administered 30 mg/kg/day of Cpd *via* intraperitoneal injection for duration of 10 consecutive days [22]. (IV) Rats were supplied Dapa (3 mg/kg/day B.W) orally, dissolved in Na+-CMC, for 10 days, alongside an intraperitoneal injection of the cpd (30 mg/kg/day) for 10 consecutive days, dosed according to the weight of each rat [23]. (V) Rats were supplied with Sil (200 mg/kg) orally, dissolved in Na+-CMC, for 10 days, alongside a 30 mg/kg/day Cpd injected intraperitoneally for 10 consecutive days, adjusted according to the weight of each rat [24].

Twenty-four hours post the final administered dose (i.e., on day 11), following euthanasia (Rats were anesthetized *via* intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine; upon achieving complete anesthesia, the rats were euthanized via cervical dislocation), the liver of each rat was promptly-isolated post-mortem and washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 to minimize degradation [25].

Preparation of Serum Samples

Following the euthanasia of rats, blood was collected from the neck and transferred to a standard tube; the clot was disrupted with a glass rod and subsequently centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. Serum was stored at –20 °C until it was used for the evaluation of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) [26].

Liver Tissue Homogenate Preparation

Subsequent to euthanization of each rat/Group, the liver was removed and rinsed with an ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) solution (pH = 7.4) to eliminate residual blood. The sample was prepared at a ratio of 1 g of liver tissue to 9ml of PBS, which was subsequently-homogenized using a homogenizer. The mixture was then centrifuged for 10minutes in a chilled centrifuge, and the supernatant was collected (26). Liver tissue homogenate was utilized to evaluate the levels of specific oxidative stress parameters (MDA, GSH, and SOD) *via* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [27].

Biochemical tests

Serum samples obtained post-sacrifice of the animals were utilized to assess ALT and AST levels, as per the kit methodology. All reagents, samples, and standards were prepared. Hundred (100 µL) of either the standards or serum samples was added to each well of the ELISA plate, which had been pre-coated with the specific antibody. The plate was subsequently-incubated at 37 °C for one hour, without performing a wash step, with 100 µL of the resultant solution. Detection Reagen A, a biotin-conjugated antibody, was added to each well. The plate was thereafter incubated at 37 °C for one hour. Subsequent to incubation, the wells were aspirated and subjected to three rinses with a 1× Wash Solution utilizing a spray bottle. The excess liquid was removed by flipping the dish onto absorbent paper. Subsequently, 100 µL of the prepared Detection Reagent B (avidin conjugated to horseradish peroxidase, HRP) was added to each well, and the plate was incubated for 30 minutes at 37 °C.The wells were then aspirated and rinsed five times as previously described. Subsequently, 90 µL of the Substrate Solution containing tetramethylbenzidine (TMB) was added to each well, and the plate was incubated for 10 to 20 minutes at 37 °C. Subsequently, 50 µL of the Stop Solution (sulfuric acid) was added to each well to terminate the reaction. The absorbance of each well was thereafter measured immediately [28].

Histological examination

A portion of hepatic tissue from each rat group was fixed in 10 % formalin prepared in PBS and stored at 4 °C for one week for histological analysis. Hepatocel-

lular necrosis was assessed by sectioning formalin-fixed liver tissues into 5 μm slices and staining them with hematoxylin and eosin (H&E) and viewed under a light microscope [29].

Statistical Analysis

All data are expressed as means ± standard deviation (SD). Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) with GraphPad Prism version 9.5.1, supplemented by the Post Hoc Tukey test for inter-group comparisons. A P-value below 0.05 was considered significant [30].

RESULTS

Effects of Dapagliflozin and Silymarin against Cyclophosphamide-Induced Hepatotoxicity:

Effects on the serum ALT level

Data analysis revealed no statistically-significant change ($P > 0.05$) in serum ALT levels between the CMC-treated rats (Group II) and the negative control (Group I), as illustrated in Figure 1. A notable elevation ($P > 0.05$) in serum ALT level was detected in rats administered Cpd intraperitoneally (30 mg/kg/day, Group III) relative to both the negative control (Group I) and the CMC (Group II). Group III exhibited serum ALT level of 47.14 ± 1.351, compared to 25.49 ± 0.6817 in Group I and 25.56 ± 1.868 in Group II, respectively. Furthermore, results depicted in Figure 1 indicated a substantial reduction ($P < 0.05$) in serum ALT level in Group IV rats, which received oral administration of Dapa with Cpd for 10 days, in comparison to the serum level in rats of the induction Group III/Cpd. Values were (31.54 ± 0.8265) compared to (47.14 ± 1.351). Furthermore, data presented in Figure 1 indicated a substantial drop ($P < 0.05$) in serum ALT levels in rats of Group V, which were orally-supplied silymarin with Cpd for 10 days, compared to the serum levels in rats of Group III (the induction Group). The relative levels are (32.13 ± 1.436) and (47.14 ± 1.351). Moreover, data depicted in Figure 1 indicated that there were no significant variations (P > 0.05) in serum ALT levels between Group IV rats and Group V rats. Levels were (31.54 ± 0.8265) and (32.13 ± 1.436), respectively.

Effects on the serum AST level

Data analysis indicated non-significant changes ($P > 0.05$) in serum AST levels between the CMC/Group II rats and the negative control/Group I rats, with respective levels of (14.33 ± 1.227) and (13.86 ± 0.7663), (Figure 2). Furthermore, a substantial rise ($P < 0.05$) in serum AST levels in Cpd/Group III rats compared to the serum levels of the negative control/Group I; where, values were respectively, (46.7 ± 2.519) compared to (13.86 ± 0.7663). In addition, the data depicted in Figure 2 indicated a substantial reduction ($P < 0.05$) in serum AST levels in Group IV, which received oral administration of Dapa with Cpd for 10 days, compared to the serum levels in rats of the induction, IP Cpd (Group III). Levels were respectively, (24.62 ± 2.4) compared to (46.7 ± 2.519). Furthermore, a substantial rise ($P < 0.05$) in serum AST levels in Group IV rats, which were orally provided Dapa with Cpd for 10 days, compared to the serum levels in Group V rats, which received Sil with Cpd for

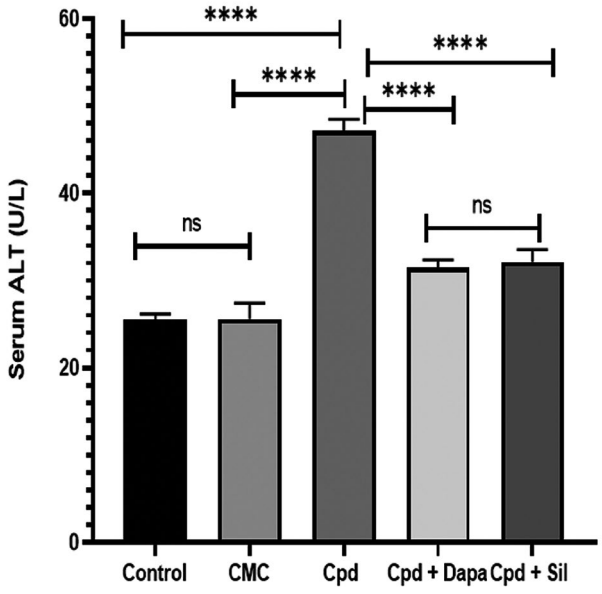


Figure 1. The Serum Levels of Alanine aminotransferase (ALT) according to Rats' Group (Data are expressed as Mean ± SD, *n* = 10; **: The highest Significant (*P* < 0.0001); ns: Non Significant)**

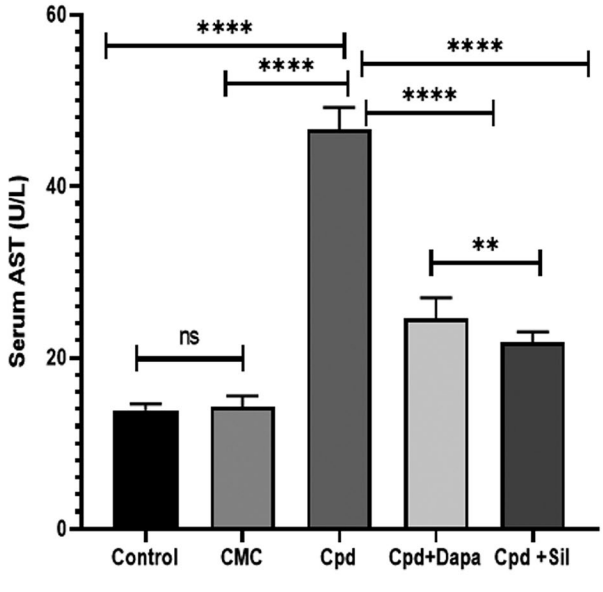


Figure 2. The Serum Levels of Aspartate aminotransferase (AST) according to Rats' Group (Data are expressed as Mean ± SD, *n* = 10; **: The highest Significant (*P* < 0.0001); **: Highly-Significant (*P* < 0.01); ns: Non Significant (*P* > 0.05))**

the same duration. The levels are (24.62 ± 2.4) compared to (21.79 ± 1.221). Besides, the outcomes depicted a significant reduction ($P < 0.05$) in serum AST level in rats of Group V, which were orally-administered sil with Cpd for 10 days, compared to the serum levels in rats of Group III (the induction); the respective levels were (21.79 ± 1.221) versus (46.7 ± 2.519).

Impact on Tissue Malondialdehyde (MDA) Concentration

Data analysis indicated that there were no significant differences ($P > 0.05$) in tissue MDA levels between the CMC/Group II rats and the negative control/Group I rats (Figure 3).

Furthermore, Figure 3 demonstrated a substantial rise ($P > 0.05$) in tissue MDA levels in Cpd/Group III animals compared to the tissue levels in the negative control/Group I. Values were (804.1 ± 111) compared to (241.8 ± 39.63).

Moreover, results depicted in Figure 3 indicated a substantial reduction ($P < 0.05$) in tissue MDA levels in Group IV rats fed Dapa orally with Cpd for 10 days, in comparison to the equivalent tissue levels in the induction Group III animals treated with Cpd. Levels are (161.7 ± 30.36) compared to (804.1 ± 111), respectively. Moreover, a significant reduction ($P < 0.05$) in tissue MDA levels in Group V rats, which were supplied silymarin orally with IP injection of Cpd for 10 days, compared to the equivalent tissue levels in Group III rats, the induction group. Values were (260.3 ± 14.52) compared to (804.1 ± 111). In addition, there was a significant reduction ($P < 0.05$) in tissue MDA levels in Group IV rats administered Dapa orally with Cpd for 10 days, compared to the tissue levels in Group V rats administered silymarin with Cpd for the same duration, measuring (161.7 ± 30.36) versus (171.3 ± 16.29).

Effects on the Reduced Glutathione (GSH) in Rats' Liver Tissue

Data analysis of Figure 4 revealed that, there were non-significant differences ($P > 0.05$) in tissue GSH level in rats of CMC/Group II compared to the corresponding tissue level in negative control/Group I rats. Moreover, a substantial drop ($P < 0.05$) in tissue GSH levels in Cpd/Group III animals in comparison to the negative control/Group I, with values of 16.31 ± 2.763 versus 34.87 ± 0.6828, respectively. Furthermore, a substantial elevation ($P < 0.05$) in tissue GSH levels in the Dapa orally supplied with Cpd for 10 days (Group IV) compared to the comparable tissue levels in the induction group (Group III) receiving Cpd. The relative levels are (47.2 ± 1.318) and (16.31 ± 2.763). Besides, the data represented in Figure 4 indicated a substantial rise ($P < 0.05$) in tissue GSH levels in rats from Group V which received oral silymarin with Cpd for 10 days, compared to the comparable tissue levels in rats from Group III, the induction group receiving only Cpd. The values were (44.69 ± 3.68) compared to (16.31 ± 2.763), respectively. Besides, a substantial elevation ($P < 0.05$) in tissue GSH levels in the group of rats that received oral Dapa with Cpd for 10 days (Group IV) compared to the levels in Group II rats that were supplied CMC orally. Levels are accordingly 47.2 ± 1.318 versus 33.7 ± 3.65. Moreover, there were no significant changes ($P > 0.05$) in tissue GSH levels between Group IV rats and Group V rats. In addition, there was a substantial rise ($P < 0.05$) in GSH tissue levels in the group of rats, which were orally supplied sil with Cpd for 10 days (Group V) compared to the comparable tissue levels in Group II rats that received CMC orally. Levels are (44.69 ± 3.68) compared to (33.7 ± 3.65).

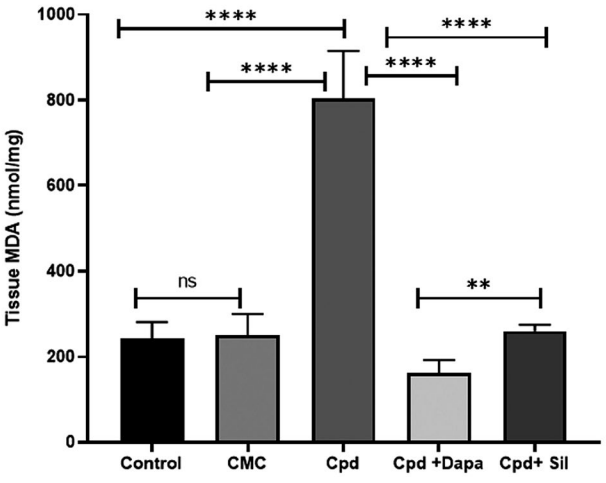


Figure 3. The Hepatic tissue Levels of malondialdehyde (MDA) according to Rats' Group (Data are expressed as Mean ± SD, $n = 10$; **: The highest Significant ($P < 0.0001$); **: Highly-Significant ($P < 0.01$); ns: Non Significant ($P > 0.05$))**

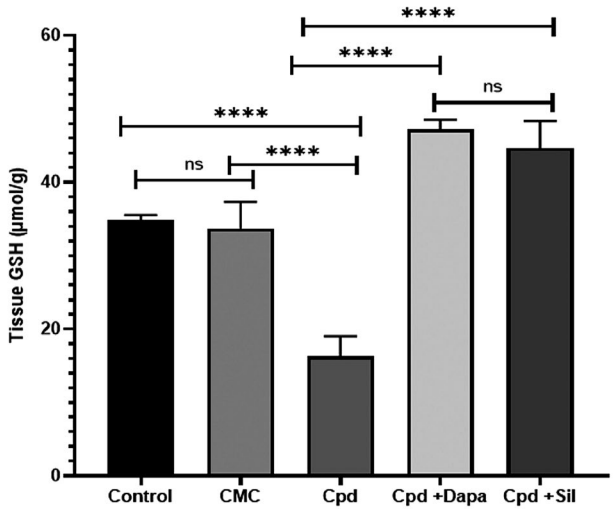


Figure 4. The Tissue Reduced Glutathione (GSH) Levels according to Rats' Group (Data are expressed as Mean ± SD, $n = 10$; **: The highest Significant ($P < 0.0001$); ns: Non Significant ($P > 0.05$))**

Effects on Hepatic Tissue Superoxide Dismutase level (SOD)

Figure 5 indicated that there were no significant differences ($P > 0.05$) in tissue SOD levels between the CMC/Group II rats and the similar tissue levels in the negative control/Group I rats.

Moreover, Figure 5 indicated a substantial decrease ($P < 0.05$) in tissue SOD levels in the Cpd/Group III rats compared to the negative control/Group I tissue levels. The levels were (7.936 ± 0.4482) compared to (64.88 ± 4.466). Furthermore, data presented in Figure 5 indicated a substantial elevation ($P < 0.05$) in tissue SOD levels in Group IV rats fed Dapa orally with Cpd for 10 days, compared to the equivalent tissue levels in the induction Group III animals receiving Cpd. The levels were (75.16 ± 4.096) and (7.936 ± 0.4482), respectively. Furthermore, results depicted in Figure 5 indicated a significant increase ($P < 0.05$) in tissue SOD levels in rats of Group V, which were orally administered Sil with Cpd for 10 days, compared to the corresponding tissue levels in rats of Group III, the induction group; where the levels were (65.35 ± 4.05) versus (7.936 ± 0.4482), respectively. Additionally, there were significant increase (P<0.05) in tissue SOD level in Group IV rats/Dapagliflozin orally-administered with Cpd compared to such tissue level in rats orally-administered silymarin with Cpd/ Group V. (75.16 ± 4.096) versus (65.35 ± 4.05).

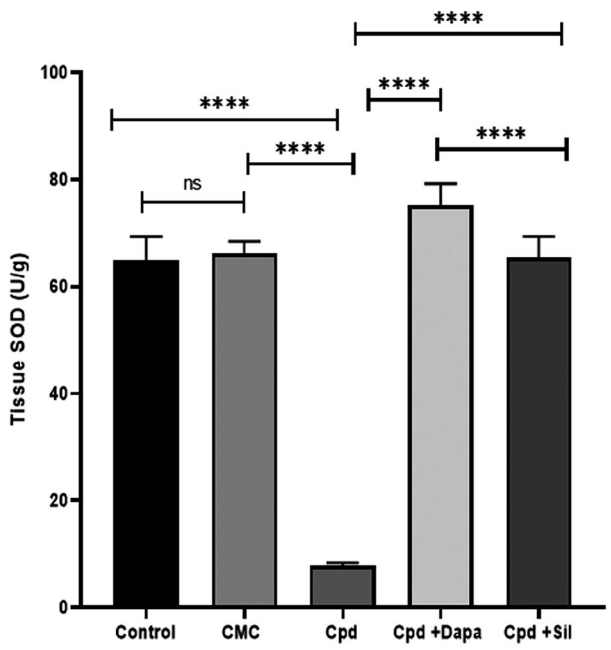


Figure 5. The Superoxide Dismutase (SOD) Tissue Levels according to Rats' Group

Histological Examination of Rats' Hepatic Tissues

The hepatic tissue segment of the experimentally healthy male rats (Group I/Negative Control) which were supplied distilled water orally, exhibited a normal histological architecture of the liver; additionally, there was an absence of congestion, inflammation, and a normal duct was observed (Figure 6).

The liver section of Group II/Positive Control male rats, which orally-administered 2 % aqueous solution of a CMC via rats oral gavage daily for 10 days showed that, there were – no congestion in the central vein or in sinusoids; but, there were mild inflammatory cells infiltrate were seen (Figure 7).

Besides, in liver tissue sections of male rats IP injected with Cpd 30 mg/kg/day for 10 consecutive days (Group III/Induction group) showed that, there were mild-congestion with mild-inflammatory cell infiltrate; and, with feathery degenerative changes in hepatocytes (a form of hepatocyte death that associated with cholestasis); moreover, there were proliferation of the bile duct, (Figure 8).

Furthermore, the section of liver tissue of male rats of Group IV/ [orally-administered Dapa (3 mg/kg/day B.W) dissolved in CMC for 10 days with Cpd (30 mg/kg/day) IP for 10 consecutive days], showed mild congestion (black arrow) with no inflammatory cell infiltrate. In

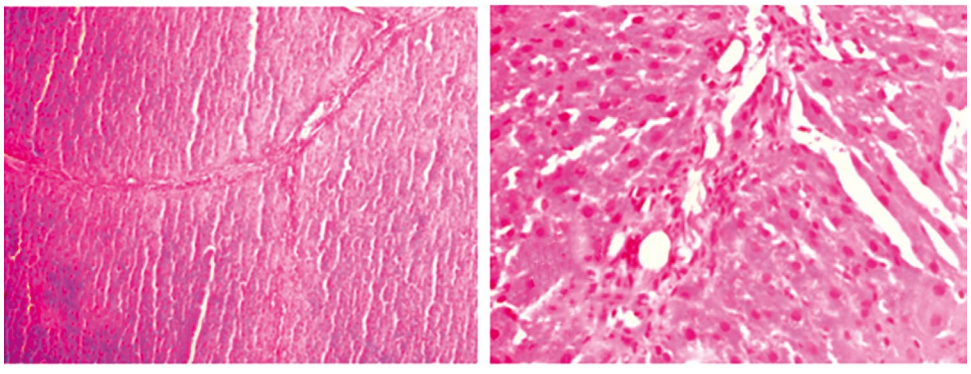


Figure 6. Hepatic section of Group I rats (Negative Control/Distilled water). Hematoxylin and Eosin stain; showed normal histological architecture of the liver mice. No congestion, no inflammation and normal duct; A: 1X, B: 40X

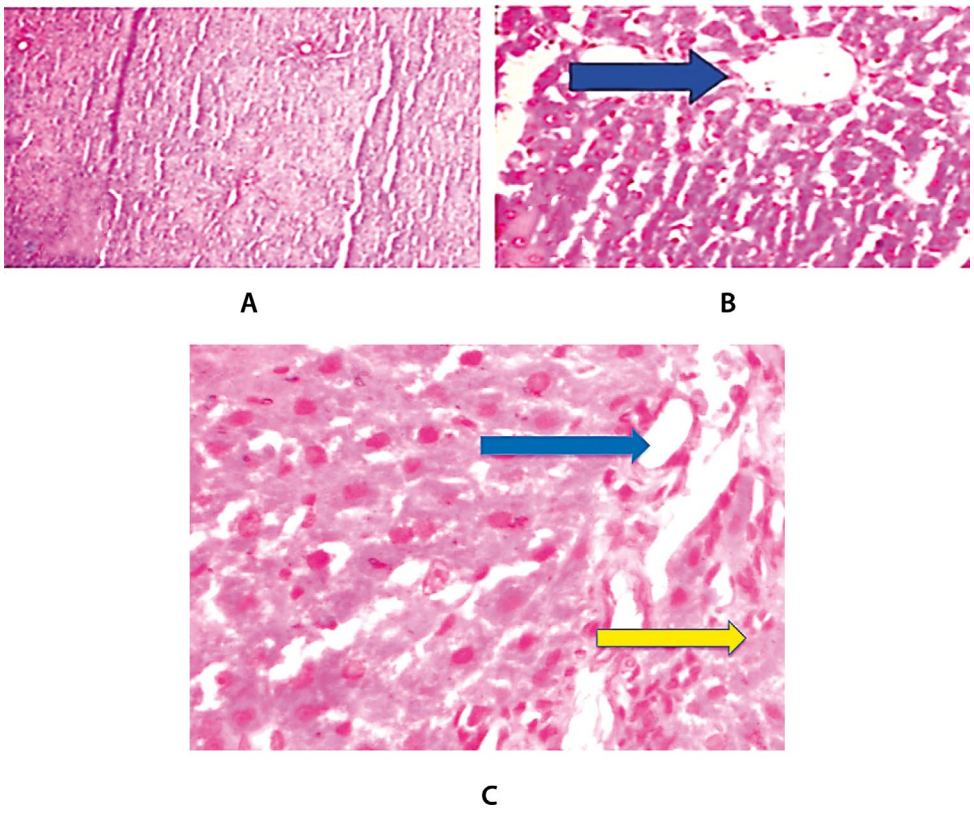


Figure 7. The effect of carboxymethyl cellulose (CMC) pretreatment on the histological architecture. No congestion in all sections in central vein or in sinusoids (blue arrows). Mild inflammatory cell infiltrate (yellow arrow), A: 10X; B: 20X; C: 40X

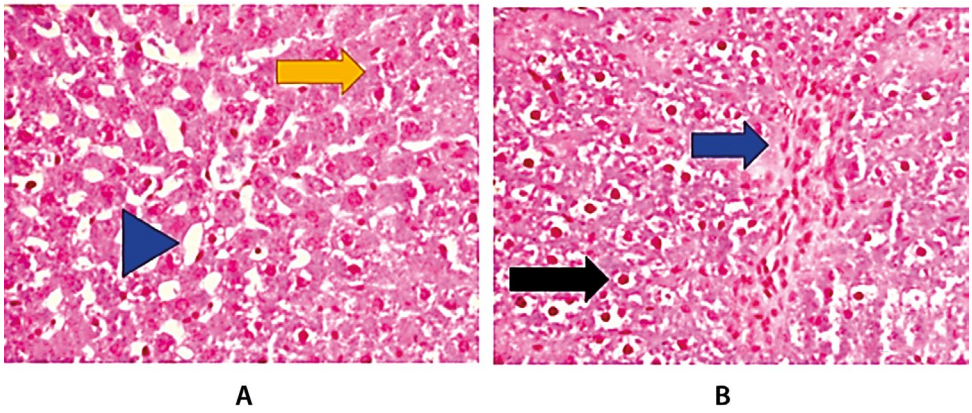


Figure 8. Photomicrographs showed the effect of intraperitoneal injection of cyclophosphamide (Cpd) 30 mg/kg/day for 10 days on the histological architecture. A: Mild congestion is seen (blue arrows). Mild inflammatory cell infiltrate (yellow arrow). B: Feathery degenerative changes in hepatocytes (black arrow) and bile duct proliferation (head-blue arrow), 40X

addition, the hepatocytes are normal with normal bile duct, (Figure 9).

In addition, sections of liver tissue of male rats of Group V Rats, which orally-administered [sil (200 mg/kg) dissolved in CMC with Cpd (30 mg/kg/day) IP injected for 10 consecutive days], there was mild congestion in the central vein (blue arrows); mild inflammatory cell infiltrate (yellow arrow) with normal hepatocytes (black arrow) were also seen (Figure 10).

DISCUSSION

Administration of Cpd (Group III) resulted in a marked increase in serum ALT and AST levels, signifying hepatocellular damage. Cpd metabolites (phosphoramide mustard, acrolein) generate reactive oxygen species (ROS) that compromise hepatocyte membrane integrity, resulting in cytosolic leakage of these enzymes [31, 32]. Treatment with dapagliflozin (Group IV)

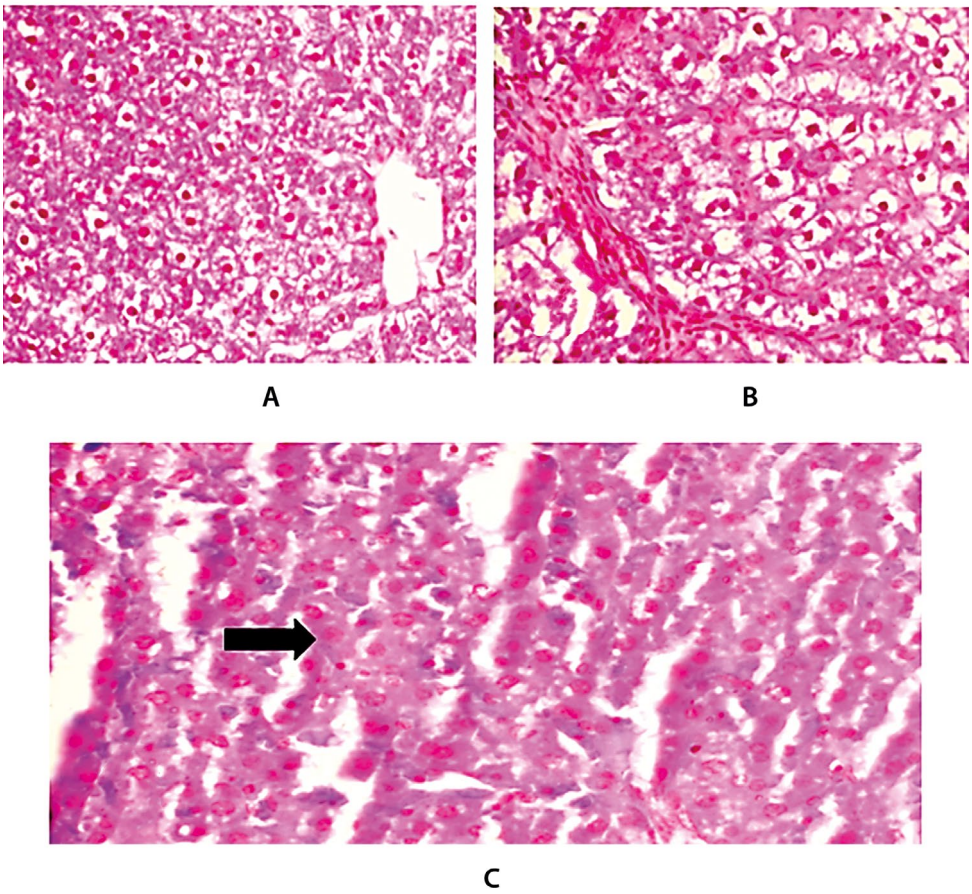


Figure 9. The effect of dapagliflozin pretreatment on the histological architecture. Mild congestion is seen (black arrow)/ (photomicrograph, no inflammatory cell infiltrate, the hepatocytes are normal with normal bile duct, 40X)

and silymarin (Group V) each with Cpd significantly reduced these enzyme levels compared to the Cpd/ Group III rats, indicating strong hepatoprotective effects. Notably, no statistically-significant difference ($P > 0.05$) was observed between dapagliflozin and silymarin in improving these parameters. These results are consistent with those of prior studies documenting the hepatoprotective effects of dapagliflozin and silymarin. For example, dapagliflozin has been shown to markedly decrease ALT and AST levels in a cisplatin-induced hepatotoxicity model [33], while silymarin has demonstrated consistent efficacy in reducing liver enzymes across various types of hepatic injury [34].

With regard to oxidative stress markers (MDA, GSH, and SOD), Cpd exposure led to elevated MDA and decreased GSH and SOD levels, reflecting enhanced oxidative stress [35]. Treatment with either dapagliflozin or silymarin each significantly-mitigated these changes, restoring antioxidant enzyme levels and reducing lipid peroxidation. These outcomes confirm the antioxidant properties of both agents, aligning with previous research [36]. Dapagliflozin has been reported to elevate antioxidant enzyme activity and decrease oxidative stress in diabetic rat models. For instance, El-Sawy et al. (2024) demonstrated that dapagliflozin reduced oxidative stress and boosted antioxidant defenses in a doxorubicin-induced nephrotoxicity model [37]. Similarly, the antioxidant effects of silymarin have been widely demonstrated. Recent studies reported that silymarin increased GSH and SOD while lowering MDA levels, thus alleviating oxidative injury [38]. A 2024 and 2025 meta-analysis confirmed that silymarin significantly reduced MDA (SMD: −1.69; $p < 0.001$) and increased SOD levels (SMD: 3.39; $p = 0.001$) [39, 40]. Other investigations further validated its protective efficacy in nephrotoxicity and salinomycin-induced toxicity models, with consistent antioxidant modulation [41].

Histopathological analysis revealed that Cpd-induced hepatic injury was characterized by congestion, inflammatory cell infiltration, and hepatocyte degeneration, as confirmed by recent studies [42]. In our experiment, treatment with dapagliflozin or silymarin alleviated these histological abnormalities and helped preserve normal hepatic architecture. This protective effect is supported by previous research confirming both drugs' ability to reverse histological damage in liver injury models [43]. For dapagliflozin, Zhao et al. (2023) showed that it improved liver histology in diabetic mice with NAFLD through downregulation of dipeptidyl peptidase-4 (DPP4), reducing hepatic steatosis and insu-

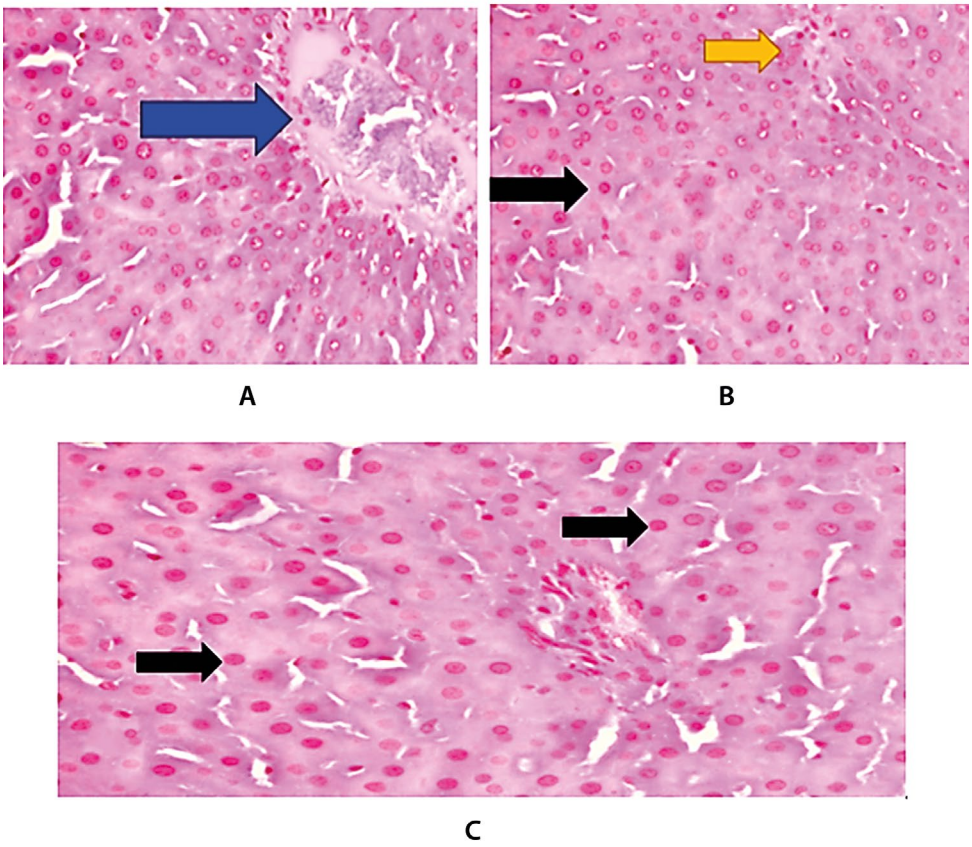


Figure 10. The effect of silymarin [(200 mg/kg) dissolved in CMC] and administered with IP injection of Cpd (30 mg/kg/day) for 10 consecutive days on the histological architecture. A: Mild congestion is seen in central vein (blue arrows). B: Mild inflammatory cell infiltrate (yellow arrow) with normal hepatocytes (black arrow). C: 40X. All the results summarized in the below graphical abstract

lin resistance [44]. Sayour et al. (2025) demonstrated that dapagliflozin mitigates steatosis, inflammation, and fibrosis, highlighting its multifaceted hepatoprotective action [45].

Silymarin, a flavonoid complex extracted from milk thistle, has been extensively evaluated for its hepatoprotective potential [46]. A 2024 systematic review by Amjad et al. involving 26 randomized controlled trials reported that silymarin significantly reduced ALT and AST levels, with improved hepatic steatosis in histology [47]. A global consensus in 2022 further endorsed silymarin's use for a range of liver disorders, including alcoholic liver disease, NAFLD, and drug-induced hepatotoxicity, attributing its efficacy to its antioxidant, anti-inflammatory, and antifibrotic effects [48].

Unlike the research conducted by Satyam et al. (2024), which investigated the synergistic hepatoprotective effects of dapagliflozin and silymarin in a carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity model with an emphasis on the modulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway, the current study is the inaugural effort to comparatively assess the distinct hepatoprotective effects of dapagliflozin and silymarin against cyclophosphamide-induced hepatic injury in rats. Our model features a unique mechanism of liver injury–primarily through acrolein-induced oxidative stress and inflammation–offering a new framework for evaluating hepatoprotection. Furthermore, our study incorporates a thorough biochemical, oxidative stress, and histological analysis to evaluate the protective efficacy of each medicine independently, rather than collectively. This methodology provides novel insights into the potential of dapagliflozin and silymarin as therapeutic alternatives instead of synergistic drugs, thereby addressing a therapeutically pertinent concern overlooked by prior studies [38]. Satyam et al. investigated the synergistic benefits of a combination therapy (dapagliflozin + silymarin) in a CCl_4-induced liver injury model; however, their study presented several drawbacks.

1. Absence of Individual Assessment: They did not assess the individual hepatoprotective efficacy of dapagliflozin and silymarin. The efficacy of each medication individually vs the superiority of their combination remains ambiguous.
2. Model-Specific Limitations: The research was performed using a carbon tetrachloride (CCl_4) model, which primarily produces hepatic injury through free radical production and lipid peroxidation. This does not comprehensively depict the mechanism of hepatotoxicity caused by chemotherapeutic me-

dicines such as cyclophosphamide (CPd), which produces acrolein and phosphoramide mustard, resulting in direct oxidative stress, mitochondrial malfunction, and inflammation.

3. Insufficient Clinical Relevance for Chemotherapy-Induced Injury: Their model failed to replicate the hepatotoxicity commonly seen by cancer patients undergoing chemotherapy (e.g., CPd-induced hepatic damage). Consequently, the relevance to oncology or chemotherapy contexts is restricted.

How Our Research Addresses This Gap:

1. A head-to-head comparison of dapagliflozin and silymarin as monotherapies is conducted to elucidate their individual efficacy.
2. We employ a CPd-induced liver injury model that more accurately represents chemotherapy-associated hepatotoxicity, yielding clinically relevant insights.
3. Our study provides a thorough assessment of hepatoprotection through biochemical, oxidative stress, and histological analyses.
4. Dapagliflozin alone demonstrates comparable efficacy to silymarin, indicating its potential repurposing as a standalone hepatoprotective agent in chemotherapy protocols.

CONCLUSION

This study demonstrates that both dapagliflozin and silymarin possess substantial hepatoprotective properties against cyclophosphamide-induced hepatic damage in rats. Each of these medicines significantly diminished hepatic enzyme increases, reduced oxidative stress, and improved histopathological changes. Our data indicate no statistically significant difference in hepatoprotection between the two agents, suggesting that dapagliflozin – a medicine typically utilized for diabetes – may be equally effective as the established hepatoprotective agent silymarin. In contrast to the study by Satyam et al. (2024), which examined the synergistic effects of combination therapy in a CCl_4-induced model, our research provides the inaugural direct comparison of the individual efficacy of dapagliflozin and silymarin in a cyclophosphamide-induced hepatotoxicity model. This additional scenario underscores the therapeutic potential of dapagliflozin as an independent drug for alleviating chemotherapy-induced liver damage and broadens its applicability beyond glycemic regulation.

REFERENCES

1. Oleiwi M. A., Zalzala M. H. Synthesis, Molecular Docking Study and Cytotoxicity Evaluation of some Quinazolinone Derivatives as Nonclassical Antifolates and Potential Cytotoxic Agents. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;31(2):283–296. DOI: 10.31351/vol31iss2pp283-296.
2. Sunar Yayla E. N., Gezgin Yıldırım D., Dündar H. A., Adrovic A., Akbörü E. G., Ayaz N. A., Aliyev E., Avar Aydın P. Ö., Aydın F., Baba Ö., Bağlan E., Makay B. B., Yücel B. B., Çakan M., Çelikel E., Demir F., Demir S., Demirkan F. G., Tekin Z. E., Şenol P. E., Guliyeva V., Güngörer V., İşgüder R., Kalyoncu M., Karadağ Ş. G., Kısaoğlu H., Kışla Ekinci R. M., Kızıldağ Z., Kurt T., Özdel S., Çiçek S. Ö., Öztürk K., Polat M. C., Sezer M., Sönmez H. E., Sözeri B., Şener S., Taşkın S. N., Türkuçar S., Ünsal E., Yıldız Ç., Bakkaloğlu S. A. Evaluation of pediatric rheumatologists' approach to rituximab use: a questionnaire study. *European Journal of Pediatrics*. 2024;183(9):3959–3968. DOI: 10.1007/s00431-024-05654-9.
3. Zalzala M. H., Kareem V. S. The Safranal Effect against Cyclophosphamide-Induced Liver Injury. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;30(2):208–213. DOI: 10.31351/vol30iss2pp208-213.
4. Alfwuaires M A. Rosmarinic acid protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity via inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis and upregulation of Nrf2 in mice. *Journal of Molecular Histology*. 2025;56(1):49. DOI: 10.1007/s10735-024-10290-6.
5. Ahmad H. A. Kathem S. H. Thymoquinone Attenuates Immune Mediated Liver Injury Induced by Concanavalin A in Mice. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;30(2):50–57. DOI: 10.31351/vol30iss2pp50-57.
6. Chang W.-T., Wu C.-C., Liao I.-C., Lin Y.-W., Chen Y.-C., Ho C.-H., Lee W.-C., Lin Y.-C., Chen Z.-C., Shih J.-Y., Wu N.-C., Kan W.-C. Dapagliflozin protects against doxorubicin-induced nephrotoxicity associated with nitric oxide pathway—A translational study. *Free Radical Biology and Medicine*. 2023;208:103–111. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.013.
7. Belen E., Canbolat I. P., Yigittürk G., Cetinarslan Ö., Akdeniz C. S., Karaca M., Sönmez M., Erbas O. Cardio-protective effect of dapagliflozin against doxorubicin induced cardiomyopathy in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2022;26(12):4403–4408. DOI: 10.26355/eurrev_202206_29079.
8. Satyam S. M., Bairy L. K., Rehman A., Nair A. A., Farook M., Binu N. N., Khan S., Yehya M., Khan M. M. Dapagliflozin and Silymarin Ameliorate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity via Nrf2/HO-1 Upregulation: A Preclinical Mechanistic Study. *Sci*. 2025;7(2):59. DOI: 10.3390/sci7020059.
9. Chang W.-T., Lin Y.-W., Ho C.-H., Chen Z.-C., Liu P.-Y., Shih J.-Y. Dapagliflozin suppresses ER stress and protects doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Archives of Toxicology*. 2021;95(2):659–671. DOI: 10.1007/s00204-020-02951-8.
10. Ahmed M. A therapeutic and protective effect of silymarin against hepatotoxicity induced by cisplatin in female rats. *Tikrit Journal for Agricultural Sciences*. 2024;24(3):74–84. DOI: 10.25130/tjas.24.3.7.
11. Liu T., Wu J., Shi S., Cui B., Xiong F., Yang S., Yan M. Dapagliflozin attenuates cardiac remodeling and dysfunction in rats with β-adrenergic receptor overactivation through restoring calcium handling and suppressing cardiomyocyte apoptosis. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2023;20(4):14791641231197106. DOI: 10.1177/14791641231197106.
12. Deger M., Isik M., Dursun M., Tamer A., Kurt B., Cetin N., et al. Protective effect of dapagliflozin against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in mice. *International Urology and Nephrology*. 2022;54(8):1851–1859. DOI: 10.1007/s11255-022-03128-7.

13. Satyam S. M., Bairy L. K., Rehman A., Farook M., Khan S., Nair A. A., Binu N. N., Yehya M., Khan M. M. Dapagliflozin: A Promising Strategy to Combat Cisplatin-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. *Biology*. 2024;13(9):672. DOI: 10.3390/biology13090672.
14. Yang J, Zhang Y, Chen X, Wang L, Ma Y, Liu Y. Silymarin alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity by downregulating CYP2E1 and preserving glutathione in mice. *Phytomedicine*. 2022;104:154276. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154276.
15. Jaffar H. M., Al-Asmari F., Khan F. A., Rahim M. A., Zongo E. Silymarin: Unveiling its pharmacological spectrum and therapeutic potential in liver diseases—A comprehensive narrative review. *Food Science & Nutrition*. 2024;12(5):3097–3111. DOI: 10.1002/fsn3.4010.
16. El-Kot G. A., Salem E. A., Soliman H. A., Ahmed R. M. Silymarin ameliorates CCl_4-induced hepatotoxicity via modulation of NF-κB signaling and inflammatory cytokines in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;161:114441. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114441.
17. Al-Shawi N. N., Rehman hussain S. A., Husam hasson A. H., Yahia zeki R., Numan N. A. M. Dose-dependent protective effects of silymarin against CCl_4-induced liver damage in rats. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*. 2005;47(3):282–285. DOI: 10.32007/jfacmedbagdad.4731621.
18. Okiljević Z., Đorđević A., Topalović D., Stanković M., Stojanović G., Šošić-Jurjević B., et al. Protective role of silymarin in paracetamol-induced oxidative liver injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2024;463:116503. DOI: 10.1016/j.taap.2024.116503.
19. Damba T.-A., Su X., Nyamdavaa K. Hepatoprotective effect of silymarin peptide on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Central Asian Journal of Medical Sciences*. 2024;5(3):12–21. DOI: 10.24079/cajms.2024.03.005.
20. Okiljević B., Martić N., Govedarica S., Andrejić Višnjić B., Bosanac M., Baljak J., Pavlić B., Milanović I., Rašković A. Cardioprotective and hepatoprotective potential of silymarin in paracetamol-induced oxidative stress. *Pharmaceutics*. 2024;16(4):520. DOI: 10.3390/pharmaceutics16040520.
21. EFSA FEEDAP Panel, Bampidis V., Azimonti G., de Lourdes Bastos M., Christensen H., Dusemund B., Durjava M. K., Kouba M., López-Alonso M., López Puente S., Marcon F., Mayo B., Pechová A., Petkova M., Ramos F., Sanz Y., Villa R. E., Woutersen R., Bories G., Gropp J., Nebbia C., Innocenti M. L., Aquilina G. Safety and efficacy of sodium carboxymethyl cellulose for all animal species. *EFSA Journal*. 2020;18(7):e06211. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6211.
22. Kara Ö. Cyclophosphamide-induced liver damage and the effect of coenzyme Q10: an experimental rat study. *International Journal of Pharmacology*. 2023;19(4):537–541. DOI: 10.3923/ijp.2023.537.541.
23. Patwa J., Khan S., Jena G. Nicotinamide attenuates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in SD rats by reducing oxidative stress and apoptosis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2020;34(10):e22558. DOI: 10.1002/jbt.22558.
24. Ahmed W. M. S. A., Soliman A., Amer A. E. A., El Shahat R. M., Amin M. M., Taha R. S., Awad M. M. Y., Abdel Hamid A. M., El-Sayed M. S., Eid E. A., Dmerdash M., Ali H. E., Fayed E. M. M., Naeem S. A. M., Elsharawy A. F., Elzahaby O. M. A. M., Ayoub M. K., Mohammed D. A. Effect of dapagliflozin against NAFLD and dyslipidemia in type 2 diabetic albino rats: possible underlying mechanisms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2023;27(17):8101–8109. DOI: 10.26355/eurrev_202309_33570.
25. Mohammed M. J., Kadhim H. M. The hepatoprotective effects of the polyphenol-enriched n-butanol fraction of *Cnicus benedictus* against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats: *In vivo* study. *Toxicology Reports*. 2025;14:101850. DOI: 10.1016/j.toxrep.2024.101850.
26. Atshan D. A., Zalzala M. H. Possible protective effect of low dose of papaverine on ANIT induced cholestasis in rat. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;32(Suppl.):118–126. DOI: 10.31351/vol32issSuppl.pp118-126.
27. Atshan D. A., Zalzala M. H. Possible protective effect of nicardipine on ANIT-induced cholestasis in rats. *Farmacia*. 2024;72(1):140–148. DOI: 10.31925/farmacia.2024.1.14.
28. Mohammed T. A., Zalzala M. H. Novel insights into bexarotene's role in preventing cholestasis: mechanisms and implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2025;398(2):10495–10508. DOI: 10.1007/s00210-025-03917-2.
29. Al-Hoshary D., Zalzala M. H. Assessment of ellagic acid action in 5 fluorouracil induced intestinal mucositis. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;32(Suppl.):33–41. DOI: 10.31351/vol32issSuppl.pp33-41.
30. Al-Kenany S.A., Al-Shawi N.N. Protective effect of cafestol on doxorubicininduced genotoxicity in rats. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;32(Suppl.):16–25. DOI: 10.31351/vol32issSuppl.pp16-25.
31. Hamzeh M., Hosseinimehr S. J., Khalatbary A. R., Mohammadi H. R., Dashti A., Amiri F. T. Atorvastatin mitigates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity via suppression of oxidative stress and apoptosis in rat model. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2018;13(5):440–449. DOI: 10.4103/1735-5362.236837.
32. Satyam S. M., Bairy L. K., Rehman A., Farook M., Khan S., Nair A. A., Binu N. N., Yehya M., Khan M. M. Dapagliflozin: a promising strategy to combat cisplatin-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Biology*. 2024;13(9):672. DOI: 10.3390/biology13090672.
33. El-Sawy W. S. M, Khalaf M. M., El-Bahrawy A. H., Messiha B. A. S., Hemeida R. A. M. Oxyresveratrol and/or dapagliflozin attenuate doxorubicin-induced nephrotoxicity via modulation of PPAR-γ/Nrf-2/HO-1, NF-κB/TNF-α/Keap-1, and Bcl-2/Caspase-3/ATG-5 signalling pathways in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024;398:5955–5967. DOI: 10.1007/s00210-024-03608-4.
34. Chang W.-T., Wu C.-C., Liao I.-C., Lin Y.-W., Chen Y.-C., Ho C.-H., Lee W.-C., Lin Y.-C., Chen Z.-C., Shih J.-Y., Wu N.-C., Kan W.-C. Dapagliflozin protects against doxorubicin-induced nephrotoxicity associated with nitric oxide pathway—a translational study. *Free Radical Biology and Medicine*. 2023;208:103–111. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.013.
35. Zalzala M. H., Kareem V. S. Safranal effect against cyclophosphamide-induced liver injury. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;30(2):208–213. DOI: 10.31351/vol30iss2pp208-213.
36. Naji Al-Shawi N., Abdel-Rehman Hussain S., Ali H. H., Rashid Y. Z., Abdel-munim Numan N. Dose-dependent protective effects of silymarin against carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver damage in rats. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*. 2023;47(3):267–270. DOI: 10.32007/JFACMEDBAGDAD.4731625.

37. El-Sawy W. S. M., Khalaf M. M., El-Bahrawy A. H., Messiha B. A. S., Hemeida R. A. M. Oxyresveratrol and/or dapagliflozin attenuate doxorubicin-induced nephrotoxicity via modulation of PPAR-γ/Nrf-2/HO-1, NF-κB/TNF-α/Keap-1, and Bcl-2/Caspase-3/ATG-5 signalling pathways in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2025;398:5955–5967. DOI: 10.1007/s00210-024-03608-4.
38. Satyam S. M., Bairy L. K., Rehman A., Attia M., Ahmed L., Emad K., Jaafer Y., Bahaaeldin A. Unlocking Synergistic Hepatoprotection: Dapagliflozin and Silymarin Combination Therapy Modulates Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 Pathway in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. *Biology*. 2024;13(7):473. DOI: 10.3390/biology13070473.
39. Bahari H., Shahraki Jazinaki M., Rashidmayvan M., Taheri S., Amini M. R., Malekahmadi M. The effects of silymarin consumption on inflammation and oxidative stress in adults: a systematic review and meta-analysis. *Inflammopharmacology*. 2024;32(4):949–963. DOI: 10.1007/s10787-023-01423-6.
40. Wu D., Chen Y., Liu H., et al. Efficacy of silymarin in reducing oxidative stress: A meta-analysis of preclinical studies. *Antioxidants*. 2025;14(2):187.
41. Zhou Y., Wang X., Li J., et al. Protective effects of silymarin against nephrotoxicity and salinomycin-induced oxidative stress: a systematic review of preclinical studies. *Phytomedicine*. 2024;110:154564. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.154564.
42. Akram W., Najmi A. K., Ehtaishamul Haque S. Levocabastine ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in Swiss albino mice: modulation of Nrf2, NF-κB p65, cleaved caspase-3 and TGF-β signaling molecules. *Journal of Molecular Histology*. 2024;56(1):3. DOI: 10.1007/s10735-024-10286-2.
43. Satyam S. M., Bairy L. K., Rehman A., Farook M., Khan S., Nair A. A., Binu N. N., Yehya M., Khan M. M. Dapagliflozin: a promising strategy to combat cisplatin-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Biology*. 2024;13(9):672. DOI: 10.3390/biology13090672.
44. Zhao Y., Liu J., Wang X., et al. Dapagliflozin improves liver histology by downregulating dipeptidyl peptidase-4 and attenuating insulin resistance in diabetic mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Front Endocrinol*. 2023;14:1145678. DOI: 10.3389/fendo.2023.1145678.
45. Sayour H. A., El-Sayed W. S., Ahmed D. M., et al. Dapagliflozin attenuates hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis in a metabolic dysfunction-associated fatty liver disease model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2025;157:114222. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.114222.
46. Alshawi N., Al-Jumaily H., Al-Hashimi S. Hepatoprotective effects of silymarin against chemically induced liver injury: A systematic review. *Phytomedicine*. 2023;112:154634. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154634.
47. Amjad A., Khan A., Riaz H., et al. Efficacy of silymarin in liver diseases: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2024;58(2):123–135.
48. Labenz C., Arslanow A., Lammert F., Galle P. R. Reply to: "An individualized cirrhosis screening strategy might be more cost-effective in the general population". *Journal of Hepatology*. 2022;77(6):1459–1491. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.08.006

13–14 мая 2026

ФАРМА

Санкт-Петербург

33-Й РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ ИМЕНИ Н. А. СЕМАШКО

НАДЕЖНОСТЬ И ОПЫТ

Более 30 лет на рынке — форум с самой длинной историей в России

МУЛЬТИФОРМАТНОСТЬ

Параллельные потоки по аналитике, маркетингу, коммерции и другим темам

ЛИДЕРЫ ОТРАСЛИ

Более 70% участников — топ-менеджеры и директора направлений

Санкт-Петербург. Май. Все участники рынка в одно время на одной площадке

АКТУАЛЬНОСТЬ И ГЛУБИНА

Программа, отвечающая изменениям рынка, с обзором тем на 360°

ГЛОБАЛЬНЫЙ ОХВАТ

Конференция, которая объединяет российскую и иностранную фарму

ВЛИЯНИЕ И ДИАЛОГ

Возможность диалога с представителями законодательной и исполнительной власти

ПОДРОБНОСТИ НА САЙТЕ

РЕГИСТРАЦИЯ НА ФОРУМ

Р..Конф

https://russian.pharma-conf.ru

РЕКЛАМА. 18+

К ЮБИЛЕЮ ИННЫ ИВАНОВНЫ ТЕРНИНКО



В декабре 2025 года отмечает юбилей доктор фармацевтических наук, начальник Центра контроля качества лекарственных средств, профессор кафедры фармацевтической химии СПХФУ, член редколлегии журналов «Разработка и регистрация лекарственных средств» и «Гербариум» **Инна Ивановна Тернинко**.

Тернинко Инна Ивановна в 1997 году окончила Украинскую фармацевтическую академию по специальности «Фармация». В 2003 году защитила кандидатскую диссертацию. В 2008 году получила ученое звание доцента по кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии. В 2012 году защитила диссертацию на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук. Долгое время преподавала и вела научную деятельность в Луганском медицинском университете, с 2015 года работает в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете. Сфера научной деятельности **Инны Ивановны** – фитохимические исследования в рамках разработки и стандартизации лекарственных средств растительного происхождения, вопросы стандартизации и контроля качества лекарственных средств. Под руководством **Инны Ивановны** защищено 7 кандидатских диссертаций. В настоящее время она является заместителем председателя диссертационного совета при СПХФУ.

Инна Ивановна пользуется заслуженным авторитетом у коллег и учеников. В 2024 г. возглавляемый **Инной Ивановной** Центр контроля качества ЛС СПХФУ получил аккредитацию по GMP. Научная школа **Инны Ивановны Тернинко** ежегодно расширяется за счет выпускников университета, пришедших в науку со студенческой скамьи.

*Уважаемая **Инна Ивановна**! Примите искренние поздравления с юбилеем от команды ЦФА, редакции журналов «Разработка и регистрация лекарственных средств» и «Гербариум»! С глубоким уважением мы относимся к Вашему профессиональному пути и научным достижениям. Ваша самоотверженная работа, мудрые знания и бесценный опыт служат вдохновением для многих поколений. Желаем Вам крепкого здоровья, неиссякаемой энергии, новых открытий и успехов в Вашей благородной деятельности! Пусть каждый день приносит радость, а все Ваши светлые мечты воплощаются в реальность.*

ПАМЯТИ ВЫДАЮЩЕГОСЯ УЧЕНОГО-ФАРМАКОЛОГА, ТАЛАНТЛИВОГО ПЕДАГОГА И ГУМАНИСТА А. Н. КУДРИНА



23.04.1918 – 01.10.1999

Александр Николаевич Кудрин родился 23 апреля 1918 года в деревне Горево Вятской губернии в семье простых крестьян. В 1935 году он поступил на лечебный факультет 1-го Московского медицинского института, который окончил в 1941 году с отличием. Далее планировалось обучение в аспирантуре, но этому помешала война. С 1941 по 1945 год **Александр Николаевич** работал начальником хирургического, а потом терапевтического отделения эвакуационного госпиталя. В 1945 он возвращается в Alma mater и поступает в аспирантуру на кафедру фармакологии, где его учителями становятся выдающиеся фармакологи – профессора В. В. Николаев и М. П. Николаев. После защиты кандидатской и докторской диссертаций он заведовал кафедрой фармакологии в Челябинске и Рязани.

В 1959–1960 годах **А. Н. Кудрин** занимает должность проректора по фармацевтическому образованию в 1-м Московском медицинском институте им. И. М. Сеченова, с 1961 по 1999 год он заведует кафедрой фармакологии фармацевтического факультета. **Александр Николаевич Кудрин** умер в 1999 году и был похоронен на Востряковском кладбище.

Научная деятельность

Александр Николаевич Кудрин был ученым с широчайшим кругом интересов. По данным Web of Science, он опубликовал 194 работы в самых различных областях (фармакология и фармация; кардиология; нейронауки; репродуктивная биология; биохимия и молекулярная биология; токсикология; гастроэнтерология; метаболомика; эндокринология и внутренние болезни и др.)

Основные теоретические исследования **А. Н. Кудрина** касаются триггерных механизмов действия медиаторов, систем мембранных рецепторов и принципов создания комбинированных лекарств, которые подавляют ключевые механизмы развития болезни и стимулируют естественные процессы выздоровления. Кудрин также разработал принципы рациональной фармакотерапии, учитывая биоритмы, и усовершенствовал методы исследования действия лекарственных веществ на изолированных органах животных (сердце, матка и кишечник). Он исследовал роль перекисного окисления липидов в развитии инфаркта миокарда и предложил использовать селенит натрия для фармакологической коррекции этого состояния. **А. Н. Кудрин** – автор двух открытий, зарегистрированных в Государственном реестре СССР:

1. «Явление изменений интенсивности перекисного окисления липидов в ишемизированных тканях (миокарда и почки)» (диплом на открытие от 13.12.1990 года № 393).
2. «Закономерность рецепторного регулирования мембранного потенциала и движения протоплазмы в растительной клетке» (диплом на открытие от 14.03.1991 года № 396).

Александр Николаевич был выдающимся ученым, чьи идеи опережали время. Он активно продвигал и развивал новые научные направления, такие как: создание гипотензивных препаратов (ингибиторов АПФ), исследование эффективности и безопасности лекарственных веществ, полученных биотехнологическими методами, разработка основ применения компьютерных систем для предотвращения несовместимости препаратов, персонализированный подход к лечению, дизайн лекарственных веществ (аминокетоны, ГАМК-производные, ветразин, фталазоны и др.). Следует отметить работы по математическому моделированию патологических состояний и поиску способов их фармакологической коррекции, а также изучению и внедрению препаратов селена в медицину. Особое внимание **Александр Николаевич** уделял поиску положительных побочных эффектов лекарственных препаратов, что открывало новые возможности для их применения.

Интересный цикл работ проведен в лаборатории **А. Н. Кудрина** по изучению роли структуры воды на действие лекарственных средств. Было установлено, что изменение кристаллического состояния воды или свойств ее упорядоченных агрегатов может влиять не только на проводимость по мембранам нервных клеток, но и на сократительные элементы миокарда.

Важные эксперименты для понимания развития психозов были выполнены на кафедре фармакологии под руководством **А. Н. Кудрина** с помощью стереотаксического введения психотомиметика LSD 25 в различные отделы головного мозга животных. Открытые в ходе исследования триггерные механизмы развития психоза под действием этого психотоми-

метика позволили целенаправленно изыскивать нейролептики, нацеленные, прежде всего, на триггерные зоны в мозге, а также на последующие патогенетические звенья развития психоза. Введение фармакологических анализаторов позволило приблизиться к пониманию нейрохимических механизмов медикаментозного психоза и объясняло недостаточную активность типичных нейролептиков на этой модели. Полученные данные хорошо согласуются с современными представлениями о нейрохимических механизмах психотомиметического действия LSD 25 связанного, главным образом, с агонистическим влиянием этого психотомиметика на серотониновые рецепторы, подтипа 5–HT2A и открытием атипичных нейролептиков. Работа внесла новые методологические подходы для прецизионного введения психотомиметика и его потенциальных антагонистов в различные отделы мозга.

В своих научных исследованиях **Александр Николаевич** активно развивал междисциплинарный подход. Так, **А. Н. Кудрин** активно работал в области направленного синтеза лекарственных средств с химиком-органиком гетероароматических соединений, профессором МГУ им. М. В. Ломоносова А. Н. Костом. В результате доклинических исследований фузариновой кислоты и ее производных β-диалкиламинокетонов были получены соединения с антиаритмическими свойствами, способностью стимулировать сокращение миометрия и другими фармакологическими эффектами. **А. Н. Кудрин** участвовал в изучении психотропных свойств ряда производных ГАМК. Дальнейшие работы Л. Г. Полевого, ученика **А. Н. Кудрина**, подтвердили перспективность этого направления и препарат фенигамма был успешно внедрен в аптечку космонавта в Институте медико-биологических проблем РАН, а в дальнейшем – разрешен для медицинского применения под названием Фенибут.

Возможности направленного синтеза производных аминокетонов, основывающиеся на большом экспериментальном и клиническом материале, были изложены в монографии «Аминокетоны: экспериментальное и клиническое изучение».

Совместная работа с кафедрой патологической физиологии под руководством профессора А. Х. Когана оказалась особенно плодотворной. Так, в результате многолетних исследований был открыт молекулярно-биологический механизм развития инфаркта миокарда, связанный с нарушениями перекисного окисления липидов, была предложена возможность фармакологической коррекции патофизиологических процессов болезни с помощью селенита натрия и селенофена, разработанных **А. Н. Кудриным**.

Патогенетический подход к изучению роли перекисного окисления липидов в развитии инфаркта миокарда оказался особенно важным в плане объяснения положительного влияния как уже известных препаратов (атенолол, сердечные гликозиды), так и новых (селенит натрия) на патогенез развития инфаркта миокарда в эксперименте. В результате большой экспериментальной работы было установлено отчетливое снижение очага инфаркта миокарда при применении антиоксиданта селенита натрия и открыты механизмы его действия при этой патологии. При личной встрече академик РАН В. П. Скулачев высоко оценил работы Александра Николаевича в этом направлении, поддержал их и выразил одобрение.

Александр Николаевич интуитивно ощущал потенциал в области разработки лекарственных препаратов, особенно путем биотехнологического синтеза. В 70–80-х годах XX века он принимает участие в качестве консультанта и соисполнителя Государственного Комитета по науке и технике 043 по изучению эффективности и безопасности биотехнологических продуктов растительного происхождения. Настойка биотехнологического женьшеня показала сопоставимую с натуральным корнем женьшеня адаптогенную активность, безопасность и соответствовала по суммарной гликозидной фракции Государственной Фармакопее X-го издания, принятой для натурального корня. Важной особенностью биотехнологического подхода являлась возможность целенаправленного синтеза активирующих или седативных фракций панаксозидов, что позволило регулировать гипертензивное действие биотехнологического препарата и выгодно его отличало от натуральных препаратов женьшеня, особенно при длительном применении, когда возникающая гипертензия от применения натурального препарата чревата различными осложнениями со стороны сердечно-сосудистой системы. **А. Н. Кудрин** впервые предложил провести сравнительное изучение возможных механизмов адаптогенного действия биомассы культуры ткани женьшеня и натурального корня с помощью фармакологических анализаторов *in vivo* и *in vitro* на различных моделях стресса, физических нагрузок, повышенного радиационного фона, гипоксии, иммуносупрессии и других неблагоприятных факторов, что позволило утверждать о сходстве механизмов натурального и биотехнологического продукта. Под руководством **А. Н. Кудрина** был выполнен полный комплекс исследований по доклиническому изучению безопасности настойки культуры ткани женьшеня, включая острую и хроническую токсичность, гистологические и биохимические исследования, канцерогенные, мутагенные свойства препарата и др. В результате исследования эффективности и безопасности препарата в клинике Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова и на кафедре психиатрии 1-го Московского медицинского института имени И. М. Сеченова, Министерство здравоохранения СССР выдало временное разрешение на использование настойки биомассы женьшеня в медицинских целях.

Еще одним перспективным направлением развития фармакологии в то время стало использование информационных технологий и разработка систем поддержки принятия решений при фармакотерапии и отпуске лекарственных препаратов в аптеке. Отдельным научным направлением исследований было

создание научных основ разработки и практического применения фармацевтических информационных систем для научно-обоснованного управления и поддержки принятия врачебных решений при проведении рациональной комбинированной фармакотерапии. Совместно с институтом фармации Минздрава СССР впервые были созданы программные таблицы несовместимости лекарственных веществ, а затем в виде официального документа Минздрава СССР была выпущена серия таблиц по взаимодействию групп лекарственных препаратов и отдельных лекарственных средств при одновременном применении. Однако, с развитием информационных технологий, объективной необходимостью стал переход от бумажной к цифровой форме представления информационных массивов данных о лекарственных средствах с использованием персональной вычислительной техники и облачных хранилищ информации. Следствием этого явились 2 разработки:

- фактографическая консультативная информационно-поисковая система по фармакотерапии, внедренная в качестве элемента в линейке программных продуктов «Электронный паспорт здоровья»;
- экспертная система по взаимодействию лекарственных препаратов, внедренная в качестве Федерального информационного сервиса в рамках создания Единой Государственной информационной системы здравоохранения РФ.

Визит основателя хронобиологии проф. Университета Миннесоты (США) Франца Халберга на кафедру фармакологии, возглавляемую **А. Н. Кудриным**, позволил вывести исследования, проводимые в области хронофармакологии, на международный уровень и получить международное признание. Ученики **Александра Николаевича** были приглашены для продолжения совместных исследований в лабораторию Франца Халберга в Миннесоту. Результаты работ по изучению хронестезии и хронергии ряда препаратов из разных фармакологических групп в разные фазы циркадных ритмов были представлены на Международных конференциях, проходивших в Израиле, США, Нидерландах и ряде союзных республик.

Под руководством **А. Н. Кудрина** разработаны принципы составления комбинированных лекарственных средств, одновременно подавляющих ключевые механизмы этиопатогенеза болезни и стимулирующих естественные компенсаторные механизмы. Успешным примером применения этого принципа является создание аналептической смеси, составные части которой обладают синергентным аналептическим действием на разные отделы ЦНС, что позволяет суммировать эффекты препаратов и снизить их токсичность. Аналептическая смесь была запатентована и внедрена в медицинскую практику.

Александр Николаевич активно работал с математиками и биостатистиками, результаты которой легли в основу монографии «Применение математических методов в медицине», которую использовало в своей экспериментальной работе не одно поколение фармакологов. До сих пор основы, предложенные в монографии, используется при подготовке студентов медико-биологического и фармацевтического профиля в Сеченовском Университете на кафедрах физики и фармакологии в рамках курса по дисциплине «Фармацевтическая информация». Под руководством **А. Н. Кудрина** в рамках международного сотрудничества с Чехословакией Владимир Долежал развил применение математических методов в клинической и экспериментальной медицине, что завершилось успешной защитой докторской диссертации.

Александр Николаевич Кудрин имел прочные научные связи с заведующей кафедрой заводской технологии член-корр. АМН СССР проф. А. И. Тенцовой, с которой был выполнен ряд работ по биофармации, способствовавших развитию направления на фармацевтическом факультете. Результаты этих исследований были доложены на Международной конференции в Японии в 1989 году и получили положительные отклики зарубежных ученых. Они послужили основой для создания теоретических разработок и ряда практических диссертационных научных работ, установивших роль вспомогательных веществ в лекарственной форме, их физико-химических свойств и других факторов, влияющих на терапевтическую эквивалентность лекарственных средств. Так, совместно с кафедрой заводской технологии лекарственных препаратов, были отработаны методики идентификации биологически активных соединений в разведении 1:5000 на модели реснитчатого эпителия нёба лягушки, созданы прикладные списки



А. Н. Кудрин на Международной Конференции в Японии, 1989 год (крайний справа). Рядом слева зав. кафедрой заводской технологии, крупный специалист в биофармации, член-корр. РАМН проф. А. И. Тенцова

лекарственных веществ, обладающих терапевтической эквивалентностью, что крайне важно для практической работы провизора и врача.

Кафедра фармакологии **А. Н. Кудрина** совместно с кафедрой фармацевтической технологии под руководством проф. Т. С. Кондратьева разработали основы персонифицированного изготовления лекарств для конкретного пациента.

Вопросы стандартизации и контроля качества комплексных препаратов растительного и животного происхождения были и остаются актуальной проблемой фармации. Оригинальные теоретическое подходы биологической стандартизации, предложенные **Александром Николаевичем**, позволили разработать оригинальные методики для оценки качества адаптогенов. Данная методика использовалась в практике при оценке качества препаратов пантокрина, экспортируемых в Японию в 80–90-х годах прошлого века и признавалась японской стороной в качестве эталона качества поставляемого препарата. Доктор В. Шрини Шринивасан, исполнительный вице-президент и главный научный сотрудник в Фармакопее США (USP) выразил интерес к научному сотрудничеству по изучению возможностей биологической стандартизации препаратов растительного происхождения, развиваемых на кафедре под руководством **А. Н. Кудрина**.

Александр Николаевич Кудрин – автор и соавтор более 300 статей, 194 из которых цитируются в Web of Science и Scopus. Как уже было сказано выше, ему принадлежат 2 открытия, а также 20 авторских свидетельств. Под его руководством защищено свыше 60 диссертаций, включая 10 докторских работ. Его научные труды отмечены четырьмя наградами ВДНХ.

А. Н. Кудрин был членом президиума Научного общества фармацевтов и членом правления Общества фармакологов, членом экспертной комиссии и пленума ВАК, членом ряда комиссий Минздрава и Минмедпрома СССР, членом редколлегии журнала «Фармация», редакционных советов журналов «Фармакология и токсикология», «Кардиология». На основе теоретических работ **А. Н. Кудрина** созданы и внедрены в практику препараты селена, аналептиков, стимуляторов матки, продуктов биотехнологического синтеза, ноотропов и транквилизаторов и др.

Его учениками были граждане Вьетнама, Египта, Монголии, Эфиопии, Туниса, Чехословакии, Германии, а также крупные ученые и организаторы фармацевтического образования нашей страны, Лауреаты Государственных премий СССР, члены Президиума СО РАН, Председатели диссертационного Совета Института общей и экспериментальной биологии СО РАН, почетные члены общества Пуркинье и обозреватели Фармакопеи США (USP) и других ведущих научных организаций мира. Доклады по результатам работ, выполненных под руководством **А. Н. Кудрина**, имели большой успех на международных конференциях (Германия, Англия, США, Израиль, Болгария, Чехословакия, Япония, Швеция и др. страны). Александр Николаевич был приглашенным экспертом ВОЗ по секции нейробиологии и общества Пуркинье.

Научная деятельность **А. Н. Кудрина** получила признание в СССР – в 1979 году ему было присвоено звание Заслуженного деятеля науки РСФСР.

А. Н. Кудрин ушел из жизни в 1999 году, но его научное наследие продолжает привлекать внимание, и по данным Web of Science, уровень цитируемости его работ в 2011 году был практически таким же, как при его жизни.

Педагогическая деятельность А. Н. Кудрина

А. Н. Кудрин определил цели и задачи преподавания фармакологии для провизоров. Он был активным сторонником внедрения в номенклатуру специальностей позиции клинического фармацевта. Им разработаны программы и учебные планы по фармакологии для студентов фармацевтических вузов и факультетов, написаны учебники «Фармакология с основами патофизиологии» (1977 г.), «Фармакология» (1991 г.), по которым обучалось не одно поколение провизоров. Профессор **А. Н. Кудрин** был одним из первых заведующих кафедрами, который внедрил Единую Методическую Систему и внес большой методологический вклад в ее развитие и совершенствование. Были выпущены методические пособия по курсу фармакологии для провизоров на основе Единой Методической Системы. **А. Н. Кудрин** стремился вырабатывать компетентностный подход у будущих специалистов, поэтому в курсе лабораторных занятий было предусмотрено выполнение студентами экспериментальной работы на клеточном (*Paramecium caudatum*), органном уровне (опыты с изолированными органами) и на целом организме. **А. Н. Кудрин** ввел правило демонстрировать на лекциях опыты с экспериментальными животными по действию лекарственных веществ. Лабораторные занятия также предусматривали выработку навыков и умений у будущих провизоров по проверке и корректировке рецепта и проведению деловых игр по информированию и консультированию пациента при отпуске лекарства, анализу Case studies. **А.Н. Кудрин** активно поддерживал внедрение в образовательную программу для провизоров компьютерных технологий для аптек, которые позволяют провизору ориентироваться в огромной номенклатуре препаратов, лекарственных формах, дозах, несовместимостях и др. Он подготовил материалы по биостатистике для главы в учебнике «Фармацевтическая информация», который написали совместно с Фармакопейной Конвенцией США (USP) для студентов фармацевтических вузов. В учебнике попытались отразить новые компетенции в сфере информации о лекарствах, необходимые выпускникам в условиях реформирования системы здравоохранения и лекарственного обеспечения в России. Также учебник развивает идею **Александра Николаевича** о подготовке клинического фарма-



А. Н. Кудрин с сотрудниками и аспирантами кафедры. Среди учеников Кудрина – член Общества Пуркинье профессор В. В. Ряженов, профессор И. И. Краснюк, декан факультета фармации и биомедицины Дальневосточного государственного медицинского университета Е. В. Слободенюк; первый декан Бурятского медицинского факультета Бурятского государственного университета С. М. Николаев; Лауреат Государственной Премии СССР за цикл работ по изучению созданию производных ГАМК с транквилизирующей активностью для аптечки космонавтов Л. Г. Полевой; член Международной Ассоциации хронобиологии О. Н. Давыдова; основатель изучения эффективности и безопасности продуктов биотехнологического синтеза адаптогенов Ф. П. Крендаль; создатель теоретических основ внедрения компьютерных технологий в фармацевтическую и медицинскую практику Н. Г. Преферанский; наблюдатель Фармакопейной Конвенции США (USP) в области информации о лекарственных средствах, биологической стандартизации лекарственных средств с комплексным составом и биоаналогов В. Н. Чубарев; члены зарубежных Университетов Польши, Чехословакии, Вьетнама, Монголии, ГДР

цевта. **А. Н. Кудрин** опередил время в педагогике, сформулировав основную идею в подготовке студента, заключающуюся в необходимости выработки фармакологического мышления у обучающихся, а не простого заучивания материала, как это было ранее. Он часто повторял, что в условиях информационного хаоса о лекарственных препаратах, следует готовить специалиста нового поколения, способного не зазубривать информацию о лекарствах, а находить ее в электронных базах данных, осмысливать и применять ее в своей практической деятельности. Такой подход полностью согласуется со всеми современными программными документами ВОЗ и ЮНЕСКО в области медицинского и фармацевтического образования.

Важной частью учебного процесса при **А. Н. Кудрине** являлось создание практикоориентированных учебно-методических пособий для провизоров, позволяющих готовить специалистов для аптечных учреждений, способных проводить информационно консультативную работу пациентов сразу же после окончания института. На базе кафедры по каждой теме были созданы наборы упаковок препаратов по каждому разделу курса и практиковались деловые игры, имитирующие профессиональную деятельность провизора, внедрены компьютерные программы по поддержке принятия решения при несовместимости лекарственных средств. Кроме того, практиковались выездные занятия со студентами на базе информационного центра Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР, где студенты осваивали знания о новых отечественных препаратах, поступивших в продажу, и новые данные об их эффективности и безопасности. На кафедре же был стенд с упаковками новых препаратов, выпускаемых отечественной фармацевтической промышленностью, структурированных на фармакологические группы в соответствии с учебной программой.

А. Н. Кудрин открыл двери в науку для многих талантливых студентов. На кафедре активно работал научный кружок, где **Александр Николаевич** часто лично участвовал в дипломных проектах, давал ценные рекомендации, обсуждал результаты и помогал с методикой. Он также часто проводил мастер-классы по постановке и проведению экспериментов на животных. У него была харизма, прису-



Да, были люди в наше время… А. Н. Кудрин с сотрудниками кафедры фармакологии фармацевтического факультета 1 – го ММИ им И. М. Сеченова (1967 год)

щая большому ученому – способность зажечь и заинтересовать студента новыми идеями. На кафедре была создана материально-техническая база, позволявшая проводить скрининг лекарственных средств и изучать патологические молекулярные механизмы, являющиеся целями лекарственных средств. **Александр Николаевич** активно привлекал своих учеников и коллег – профессоров и Лауреатов Государственных премий из кардиологического центра, ВНИИ по БИХС, Института медико-биологических проблем к работе со студентами, что позволяло начинающим испытателям работать по перспективным направлениям в области кардиологии, нейрофармакологии, космической медицины с ведущими учеными страны и перенимать их богатый опыт в фармакологии. Результаты студенческих исследований активно обсуждались на кафедральных заседаниях и использовались в научных учреждениях страны.

Александр Николаевич был известным популяризатором науки. Он написал шесть брошюр для общества «Знание». Большое внимание уделял профилактике в медицине, под его руководством были разработаны образовательные программы для населения, направленные на профилактику заболеваний, в том числе ятрогенных. Его статьи для населения были опубликованы в центральной печати (газета «Известия» и др.) и научно-популярных журналах (Наука и жизнь и др.). Под его руководством разработали цикл лекций о повышении эффективности и безопасности лекарств, которые профессора и доценты кафедры читали в профсоюзных медучреждениях. **Александр Николаевич** блестяще выступал с лекциями по геронтологии в профильном институте. Его выступления всегда пользовались популярностью и привлекали много слушателей.

Доцент кафедры фармакологии Сологова Сусанна Сергеевна с глубоким чувством благодарности и признательности вспоминает лекции **Александра Николаевича** во время обучения в ВУЗе, которые внесли неоценимый вклад в формирование ее академической базы и способствовали сохранению памяти о значимых достижениях в области фармакологии для будущих поколений студентов. «Профессионализм, эрудиция и искренняя преданность своему делу **Александра Николаевича** всегда служили для меня эталонными примерами истинного Учителя. Лекции профессора **А. Н. Кудрина** стали не только источником глубоких теоретических знаний, но и катализатором для моего личностного и профессионального роста. Они выходили за рамки традиционного образовательного процесса, представляя собой настоящие научные открытия, которые были не только информативными, но и чрезвычайно интересными и живыми. Я горжусь тем, что имела возможность обучаться у **Александра Николаевича**, и считаю этот опыт одной из самых значимых и вдохновляющих страниц моего академического пути», – отмечает Сусанна Сергеевна.

Под руководством **Александра Николаевича** кафедра фармакологии занимала в течение 10 лет первые места в научной, педагогической и воспитательной деятельности. В знак выдающихся достижений кафедры, которую возглавлял **А. Н. Кудрин**, ректор Первого Московского медицинского института им. И. М. Сеченова, член-корреспондент АМН СССР, профессор В. И. Петров, торжественно передал коллективу кафедры переходящее знамя победителя соревнования.



Ректор 1-го ММИ им. И.М. Сеченова В. И. Петров вручает зав. кафедрой фармакологии фармацевтического факультета А. Н. Кудрину переходящее знамя на вечное хранение в знак выдающихся заслуг кафедры (1983 год)

Ученый-гуманист

Профессия врача считается одной из самых гуманных. Пройдя трудными дорогами Великой Отечественной войны, **Александр Николаевич** глубоко осознал ценность человеческой жизни. Он мастерски организовал работу эвакогоспиталя, часто сам оперируя раненых. **Александр Николаевич** вспоминал, что в условиях нехватки медикаментов под его руководством начали собирать лекарства из растений, зеленую перевязочную и дезинфицирующие средства. Эта «зеленая аптека» спасла сотни солдатских жизней. Огромный накопленный опыт изучения организма человека в экстремальных условиях в дальнейшем лег в основу теоретических изысканий по изменению чувствительности и реактивности организма к лекарственным средствам возбуждающего и тормозного действия на ЦНС, констилляционных взаимодействий, создания отечественных аналептиков, включая аналептическую смесь основанную на развиваемой им теории комбинированного действия лекарственных веществ, поиск лекарственных препаратов растительного и животного происхождения для повышения физической и психической резистентности организма к различным неблагоприятным факторам внешней среды. Служба в армии воспитала в **Александре Николаевиче** высокие стандарты самодисциплины, умение мыслить стратегически в работе врача и выполнении служебных обязанностей. Он всегда ответственно подходил к задачам, находил нестандартные решения и проявлял гуманизм в отношении пациентов. **Александр Николаевич** стремился помогать людям в сложных ситуациях, чутко относился к проблемам своих подчиненных и придерживался высоких моральных принципов. К нему можно в полной мере отнести замечательные слова известного врача, историка медицины Ф. Л. Германа: «В медицине, как в области всякой науки, всякого искусства, существуют свои традиции, существуют свои идеалы, которыми одухотворяется и направляется деятельность и стремления ее жрецов. Лишенная этих идеалов, медицина как наука пала бы до бессодержательной доктрины, до знахарства, а как искусство – до фельдшеризма, до простого ремесла».

Александр Николаевич Кудрин обладал высокими человеческими качествами и гуманизмом, что притягивало к нему людей. Его уважали и ценили коллеги, студенты и сотрудники фармацевтического факультета. 1 октября 1999 года он ушел из жизни. С тех пор прошло почти 26 лет, но его имя, как гуманиста, педагога, ученого и Человека с большой буквы до сих пор живет в сердцах тех, кто с ним работал, кто у него учился и кто продолжает его дело.

Коллектив кафедры фармакологии Института фармации им. А. П. Нелюбина:

В. Н. Чубарев – к.б.н., профессор кафедры фармакологии Института фармации им. А. П. Нелюбина;

С. С. Сологова – к.б.н., доцент кафедры фармакологии Института фармации им. А. П. Нелюбина;

Н. Г. Преферанская к.ф.н., доцент кафедры фармакологии Института фармации им. А. П. Нелюбина;

Е. А. Смолярчук – к.м.н., заведующая кафедрой фармакологии Института фармации им. А. П. Нелюбина.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-249-250

Check for updates

CC BY 4.0

Первый дженерик тирзепатида GP30931: физико-химическое и биологическое сходство с референтным лекарственным средством

И. А. Луговик, А. В. Бабина, С. С. Арутюнян, Д. О. Ермолаева, В. Б. Сапарова, Т. Н. Кобелева, П. Г. Заикин, А. Д. Микушина, А. С. Букатин, И. Е. Елисеев, Б. Ц. Зайчик, Я. К. Керученько, И. С. Охрименко, Э. В. Бочаров, А. Х. Тальдаев, В. А. Лушпа, И. Е. Макаренко, Р. В. Драй

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2025;14(2):54–74. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-2084. Статья опубликована: 20.05.2025.

На странице 64 и 65 в исходную версию статьи авторы в таблице 2 поменяли некоторые значения в некоторых строках в столбцах GP30931 и Мунджаро®.

Вместо:

Метод Method	**Атрибут** Attribute	**GP30931**	**Мунджаро®** Mounjaro®
Родственные примеси Related impurities			
SEC Size-Exclusion Chromatography	ВМБ, % High Molecular Weight Species, %	0,25–0,26	0,11–0,14
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM129, %	0,63–0,64	0,09–0,11
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM127, %	0,59–0,60	0,12–0,14
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM027, %	0,75–0,77	0,12–014
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	Максимальная единичная примесь, % Maximum single impurity, %	0,37–0,46	0,05–0,12
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	Сумма примесей, % Total impurities, %	3,84–3,93	0,59–0,87

Исправлено на:

Метод Method	**Атрибут** Attribute	**GP30931**	**Мунджаро®** Mounjaro®
Родственные примеси Related impurities			
SEC Size-Exclusion Chromatography	ВМБ, % High Molecular Weight Species, %	0,11–0,14	0,25–0,26
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM129, %	0,09–0,11	0,63–0,64
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM127, %	0,12–0,14	0,59–0,60
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM027, %	0,12–014	0,75–0,77
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	Максимальная единичная примесь, % Maximum single impurity, %	0,05–0,12	0,37–0,46
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	Сумма примесей, % Total impurities, %	0,59–0,87	3,84–3,93

Внесение исправление не повлияло на содержание статьи.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

The first generic tirzepatide GP30931: physicochemical and biological similarity to the reference drug

Ilya A. Lugovik, Anna V. Babina, Sona S. Arutyunyan, Darya O. Ermolaeva, Valeriya B. Saparova, Tatyana N. Kobeleva, Pavel G. Zaikin, Anna D. Mikushina, Anton S. Bukatin, Igor E. Eliseev, Boris Ts. Zajchik, Yan S. Keruchenko, Ivan S. Ohrimenko, Eduard V. Bocharov, Amir Kh. Taldaev, Vladislav A. Lushpa, Igor E. Makarenko, Roman V. Drai

Drug development & registration. 2025;14(2):54–74. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-2084. Published: 20.05.2025.

On pages 64 and 65 of the original version of the article, the authors changed some values in some rows in the GP30931 and Munjaro® columns in Table 2.

Instead:

Method	Attribute	GP30931	Mounjaro®
Related impurities			
Size-Exclusion Chromatography	High Molecular Weight Species, %	0,25–0,26	0,11–0,14
RP-HPLC	G27-IM129, %	0,63–0,64	0,09–0,11
RP-HPLC	G27-IM127, %	0,59–0,60	0,12–0,14
RP-HPLC	G27-IM027, %	0,75–0,77	0,12–014
RP-HPLC	Maximum single impurity, %	0,37–0,46	0,05–0,12
RP-HPLC	Total impurities, %	3,84–3,93	0,59–0,87

Corrected to:

Method	Attribute	GP30931	Mounjaro®
Related impurities			
Size-Exclusion Chromatography	High Molecular Weight Species, %	0,11–0,14	0,25–0,26
RP-HPLC	G27-IM129, %	0,09–0,11	0,63–0,64
RP-HPLC	G27-IM127, %	0,12–0,14	0,59–0,60
RP-HPLC	G27-IM027, %	0,12–014	0,75–0,77
RP-HPLC	Maximum single impurity, %	0,05–0,12	0,37–0,46
RP-HPLC	Total impurities, %	0,59–0,87	3,84–3,93

The correction did not affect the content of the article.

The online version of the article on the journal's website has been updated.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-251

Check for updates

CC BY 4.0

Оптимизация технологических параметров получения липидных наночастиц как систем доставки лекарственных средств

Ю. М. Коцур, С. Д. Малков, К. О. Зарифи, К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Е. В . Флисюк, И. А. Наркевич

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2025;14(4):101–107. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2195. Статья опубликована: 24.10.2025.

На странице 101 в исходную версию статьи авторы добавили аффилиацию двух авторов Ю. М. Коцур и К. А. Гусева.
Вместо: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А
Исправлено на: [1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России). 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Внесение исправление не повлияло на содержание статьи.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

Optimisation of technological parameters for production of lipid nanoparticles for delivery of mRNA

Yuliya M. Kotsur, Sergey D. Malkov, Kseniya O. Zarifi, Konstantin A. Gusev, Denis N. Maimistov, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich

Drug development & registration. 2025;14(4):101–107. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2195. Published: 24.10.2025.

On page 101 of the original version of the article, the authors added the affiliation of two authors, Yuliya M. Kotsur and Konstantin A. Gusev.
Instead: Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
Corrected to: [1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russia

The correction did not affect the content of the article.

The online version of the article on the journal's website has been updated.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этичного поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**, должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки, фармацевтические науки, биологические науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.
2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

   Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – http://www.consort-statement.org

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате А4 Microsof Word (*doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: http://elibrary.ru

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдранол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте http://www.translit.ru

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychophar-macogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *tif, *jpg, *cdr, *ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

Гербариум
Научный журнал

Новый научный журнал «Гербариум»

Разделы журнала



- ☑ Фармацевтическая ботаника
- ☑ Химия природных соединений
- ☑ Анализ и стандартизация лекарственного растительного сырья
- ☑ Технология фитопрепаратов
- ☑ Биотехнология лекарственных растений
- ☑ Биологическая активность природных субстанций
- ☑ Лекарственное растениеводство. Заготовка лекарственного растительного сырья. Ресурсоведение

Научный рецензируемый журнал «Гербариум» объединяет исследователей и производителей, работающих в области фармакогнозии, фармацевтической ботаники, а также в сфере поиска, создания и применения лекарственных средств растительного и иного природного происхождения.

Главный редактор журнала

Шохин Игорь Евгеньевич



Сайт журнала

научно-производственный журнал
РРЛС
разработка и регистрация лекарственных средств

Журнал является Open Access изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки, фармацевтические науки, биологические науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- ➢ Услуга комплексного перевода.
- ➢ Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- ➢ При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.





Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**

научно-производственный журнал

РРЛС

разработка и регистрация лекарственных средств



Электронный журнал

Печатный журнал

Информационный ресурс

Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Наша аудитория:

Среди наших читателей специалисты и руководители отделов разработки ЛС, контроля и обеспечения качества, специалисты по ДКИ, КИ, отделов регистрации, сотрудники аналитических лабораторий, технологи, инженеры, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний.

Разделы журнала:

- Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- Фармацевтическая технология.
- Методы анализа лекарственных средств.
- Доклинические и клинические исследования.
- Регуляторные вопросы.

Аудитория **10 000+**
Нас читают **Россия, СНГ**

Партнер ключевых мероприятий отрасли

Периодичность выхода журнала **4 раза в год**

Распространяется **бесплатно**

Мы в Telegram

По вопросам сотрудничества

info@pharmjournal.ru
info@chpa.ru