



2017 | Том / Volume V

№ 3

Научно-практический журнал  
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266  
e-ISSN 2413-2241

# ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY



## Обзоры, лекции

Reviews, Lectures

## Фармакогнозия, ботаника

Pharmacognosy, Botany

## Фармацевтическая технология и биотехнология

Pharmaceutical Technology  
and Biotechnology

## Фармацевтическая и токсикологическая химия

Pharmaceutical and Toxicological  
Chemistry

## Фармакология и клиническая фармакология

Pharmacology and Clinical  
Pharmacology

## Информационные технологии в фармации

Information Technologies in Pharmacy

## Организация и экономика фармацевтического дела

Organization and Economy  
of Pharmacy

## Экономика и менеджмент медицины

Economy and Management  
of Medicine

## Фармацевтическое образование

Pharmaceutical Education

## Краткие сообщения

Brief Reports

## Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии

Discussions, Referee Reports,  
Anniversaries, Schools  
of Thought, History  
of Pharmacy and  
Pharmacology



**ПМФИ**  
Филиал ВолгГМУ

## **ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ**

Научно-практический журнал  
Периодичность 6 номеров в год  
**Том 5, Выпуск № 3, 2017**

Свидетельство регистрации СМИ: ПИ № ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

### **Главный редактор**

Петров Владимир Иванович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

### **Заместитель главного редактора**

Озеров Александр Александрович доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

### **Редакционная коллегия**

#### **Фармакогнозия, ботаника**

Куркин Владимир Александрович доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия.

Зилфикаров Ифрат Назимович профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

#### **Фармацевтическая технология и биотехнология**

Саканян Елена Ивановна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

#### **Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации**

Вавер Ивона PhD, профессор, г. Варшава, Польша

#### **Фармакология и клиническая фармакология**

Ханферьян Роман Авакович доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия.

Буске Паскаль MD, профессор, г. Страсбург, Франция

#### **Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины**

Наркевич Игорь Анатольевич доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Краткие сообщения / Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

**Ответственный секретарь:** Корянова Ксения Николаевна,  
кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

**Корректор:** Санникова Евгения Геннадиевна, г. Пятигорск, Россия

*Адрес редакции: 357532, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.*

*Пятигорский медико-фармацевтический институт –  
филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России*

*Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: [pharmjournal@mail.ru](mailto:pharmjournal@mail.ru)*

*Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183  
Формат А4, тираж 1000 экз.*

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, Киберленинка, Соционет, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE.

*Отпечатано в ООО «Рекламно-информационное агентство на Кавминводах»  
357500, Ставропольский край, г. Пятигорск, ул. Февральская, 54*

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный  
медицинский университет» Минздрава России, 2017  
© Пятигорский медико-фармацевтический институт –  
филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2017  
© Авторы, 2017

**ISSN 2307-9266**  
**e-ISSN 2413-2241**

## PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal

Periodicity is 6 issues a year

Volume V, Issue N 3, 2017

The mass media registration certificate: ПИ № ФС77–67428 от 13.10.2016

### Editor-in-Chief

Petrov Vladimir Ivanovich      Academician RAS, Doctor of Science (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

### Deputy Editor-in-Chief

Ozerov Aleksandr Aleksandrovich      Doctor of Science (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

### Editorial Board

#### Pharmacognosy, Botany

Kurkin Vladimir Aleksandrovich      Doctor of Science (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Zilfikarov Ifrat Nazimovich      Doctor of Science (Pharmacy), Professor of the RAS, Moscow, Russia

#### Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Sakanyan Elena Ivanovna      Doctor of Science (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

#### Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer      PhD, Professor, Warsaw (Poland)

#### Pharmacology and Clinical Pharmacology

Khanfer`yan Roman Avakovich      Doctor of Science (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet      MD, Professor, Strasbourg, France

#### Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Narkevich Igor Anatolyevich      Doctor of Science (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

**Executive Editor:** Koryanova Ksenia Nikolaevna, Candidate of Pharmacy, Pyatigorsk, Russia

**Proofreader:** Sannikova Evgeniya Gennadievna, Pyatigorsk, Russia

*Editors office address: 357532, Pyatigorsk, Kalinina, 11.*

***Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University***

*Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: [pharmjournal@mail.ru](mailto:pharmjournal@mail.ru)*

*Union catalogue. Russian Press/ Newspapers and journals. Code 94183*

*A4 size, 1000 issues circulation.*

**Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE.**

*Printed in open company "Advertising and information Agency on the Caucasian mineral waters"  
357500, Stavropol region, Pyatigorsk, St. February, 54*

**ISSN 2307-9266**  
**e-ISSN 2413-2241**

© Volgograd State Medical University  
of Russian Ministry of Health, 2017

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –  
branch of Volgograd State Medical University, 2017

©Authors, 2017

---

---

**СОДЕРЖАНИЕ**  
**CONTENS**

**Обзоры, лекции**  
**Reviews, Lectures**

*Н.М. Насухова, Л.А. Логвиненко,  
А.Л. Харченко, Д.А. Коновалов*

*N.M. Nasukhova, L.A. Logvinenko,  
A.L. Kharchenko, D.A. Kononov*

|                                                                    |     |                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------|-----|
| БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА<br>ЛИСТЬЕВ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО ..... | 200 | BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES<br>OF THE LAURUS NOBILIS LEAVES ..... | 200 |
|--------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------|-----|

**Фармакогнозия, ботаника**  
**Pharmacognosy, Botany**

*М.А. Марченко, И.Н. Зилфикаров,  
Т.А. Ибрагимов, А.Г. Малеев*

*M.A. Marchenko, I.N. Zilfikarov,  
T.A. Ibragimov, A.G. Maleev*

|                                                                                                               |     |                                                                                                      |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ<br>СУХОГО ЭКСТРАКТА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ<br>ПРЕПАРАТОВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО..... | 222 | DEVELOPMENT OF THE METHODS OF<br>STANDARTIZATION DRY EXTRACT<br>AND MEDICAL DRUGS GINKGO BILOBA..... | 222 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

**Фармацевтическая технология и биотехнология**  
**Pharmaceutical Technology and Biotechnology**

*Т.В. Попова, Н.О. Карабинцева,  
Л.Н. Рачковская, Т.Г. Толстикова,  
А.А. Котлярова, А.Ю. Летагин*

*T.V. Popova, N.O. Karabinceva,  
L.N. Rachkovskaya, T.G. Tolstikova,  
A.A. Kotlyarova, A.Yu. Letyagin*

|                                                                                                                  |     |                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ<br>ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО<br>СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА<br>С ДЕТОКСИКАЦИОННЫМ ЭФФЕКТОМ ..... | 242 | THE POSSIBILITY OF CREATING<br>MULTIFUNCTIONAL<br>SILVER-CONTAINING<br>DRUGS WITH DETOXIFYING EFFECT ..... | 242 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

**Фармацевтическая и токсикологическая химия**  
**Pharmaceutical and Toxicological Chemistry**

*Д.Р. Сабирзянов., Ю.Н. Карпенко,  
Т.Л. Малкова, И.В. Алексеева*

*D.R. Sabirzyanov, Yu.N. Karpenko,  
T.L. Malkova, I.V. Alekseeva*

|                                                                                  |     |                                                                                           |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ<br>В СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА<br>МЕТОДОМ ВЭЖХ..... | 254 | DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES<br>IN THE ANILOCAINE<br>SUBSTANCE BY HPLC METHOD..... | 254 |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

*Н.М. Червонная, И.И. Харченко,  
С.Л. Аджирахметова, Л.П. Мыкоц,  
О.А. Андреева, Э.Т. Оганесян*

*N.M. Chervonnaya, I.I. Kharchenko,  
S.L. Adzhiakhmetova, L.P. Mykots,  
O.A. Andreeva, E.T. Oganessian*

|                                                                                                                                                     |     |                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-<br>ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ<br>ВЕЩЕСТВ ИЗ ШРОТА СОЦВЕТИЙ<br>БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ<br>(TAGETES PATULA L.) ..... | 267 | DETERMINATION OF SOME PHYSICAL<br>AND CHEMICAL PROPERTIES OF PECTIN<br>SUBSTANCES FROM THE SOLVENT CAKE<br>OF TAGETES PATULA L.<br>INFLORESCENCES ..... | 267 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

**Фармакология, клиническая фармакология**  
**Pharmacology, Clinical Pharmacology**

*Ф.В. Гладких*

*F.V. Hladkykh*

|                                                                                                                                                                                     |     |                                                                                                                                                                                  |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ<br>АНТИУЛЬЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ<br>АГОНИСТОВ ВАНИЛОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ<br>(TRPV1) НА МОДЕЛИ ГАСТРОПАТИИ,<br>ИНДУЦИРОВАННОЙ<br>АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ..... | 283 | CHARACTERISTIC OF MECHANISMS<br>OF ANTIULCEROGENIC ACTION<br>OF AGENTS OF VANILLOID RECEPTORS<br>(TRPV1) ON THE MODEL<br>OF GASTROPATHY INDUCED<br>BY ACETYLSALICYLIC ACID ..... | 283 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

УДК 582.677.2:615.322

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЛИСТЬЕВ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО

Н.М. Насухова<sup>1</sup>, Л.А. Логвиненко<sup>2</sup>, А.Л. Харченко<sup>2</sup>, Д.А. Коновалов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

<sup>2</sup>ФГБУН «НБС-ННЦ», 298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита

E-mail: d.a.konovalev@pmedpharm.ru

Лавр благородный – *Laurus nobilis* L. – вечнозелёное двудомное, редко однодомное, растение высотой до 12–15 м. Название растения посвящено древнегреческому богу солнца Аполлону и является символом мира и победы. Из него делали венки для императоров, генералов и поэтов. Естественными местами лавра благородного являются территории стран Средиземноморья с высоким годовым уровнем атмосферных осадков. Выращивается как декоративный вид в Европе, России, США и других странах. Культивируется в Турции, Алжире, Марокко, Португалии, Испании, Италии, Франции, России и Мексике. **Цель исследования** – обзор доступной литературы о выделении, идентификации, количественном определении биологически активных соединений листьев лавра благородного и установленных видах их фармакологической активности. **Материалы и методы.** Исследование проводилось с использованием информационно-поисковых (PubMed, CiteSeer, arXiv), библиотечных баз данных (eLibrary, Cyberleninka) и бесплатной социальной сети ResearchGate. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что листья лавра благородного в качестве основных действующих веществ содержат компоненты эфирного масла, фенольные соединения и сесквитерпеновые лактоны. Качественный состав и количественное содержание этих групп природных соединений в этом сырье варьирует в зависимости от эколого-географических, эдафических, климатических факторов, фазы развития растений, технологии выращивания, способа сушки и т.д. Результаты известных фармакологических исследований извлечений, суммарных фракций и индивидуальных соединений листьев лавра благородного характеризуют данный вид сырья как перспективный источник для дальнейшего более глубокого исследования. **Заключение.** Как показали, представленные в обзоре данные, имеющиеся в открытом информационном доступе, компоненты эфирного масла, фенольные соединения (фенольные кислоты, флавоноиды и др.), сесквитерпеновые лактоны лавра благородного проявляют разнообразный спектр фармакологической активности. Антимикробная (в широком смысле), противовирусная, противовоспалительная, антидиабетическая и цитотоксическая (противораковая) активности, установленные у извлечений, отдельных фракций и индивидуальных соединений листьев лавра, являются перспективными, с точки зрения будущих исследований и разработки новых лечебно-профилактических и лекарственных средств.

**Ключевые слова:** лавр благородный, *Laurus nobilis*, эфирное масло, фенольные соединения, сесквитерпеновые лактоны, фармакологическая активность

## BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE LAURUS NOBILIS LEAVES

N.M. Nasukhova<sup>1</sup>, L.A. Logvinenko<sup>2</sup>, A.L. Kharchenko<sup>2</sup>, D.A. Konovalev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, 357532, Russia

<sup>2</sup>Nikitsky Botanic Garden, Nikita, Yalta, Republic of Crimea, 298648, Russia

E-mail: d.a.konovalev@pmedpharm.ru

*Laurus nobilis* L. is an evergreen dioecious, rarely monocious plant up to 12–15 m high. The plant's name is devoted to an Ancient Greek God of Sun Apollo and is a symbol of peace and victory. It was used in making up wreaths for emperors, generals, and poets. Its natural area includes Mediterranean countries with high level of

### Для цитирования:

Насухова Н.М., Логвиненко Л.А., А.Л. Харченко, Д.А. Коновалов «БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЛИСТЬЕВ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО. Фармация и фармакология. 2017;5(3):200–221. DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-200-221

© Насухова Н.М., Логвиненко Л.А., А.Л. Харченко, Д.А. Коновалов, 2017.

### For citation:

Nasukhova N.M., Logvinenko L.A., A.L. Kharchenko, D.A. Konovalev "BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE LAURUS NOBILIS LEAVES". Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):200–221. (In Russ.) DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-200-221

annual precipitation. It is actively cultivated as a decorative plant in Europe, Russia, USA and other countries. It is cultivated in Turkey, Algeria, Morocco, Portugal, Spain, Italy, France, Russia, and Mexico. **The aim** of the study is the review of available literature about isolation, identification, quantitative determination of biologically active compounds of the *Laurus nobilis* leaves in the established species and their pharmacological activity. **Materials and methods.** The study was carried out using searching (PubMed, CiteSeer, arXiv), library databases (eLibrary, Cyberleninka), and ResearchGate free social network. **Results and discussion.** We have established that *Laurus nobilis* leaves have components of essential oil, phenolic compounds, and sesquiterpenic lactones as the principal active substances. Qualitative composition and quantitative content of these compound groups in these raw materials varies depending on the ecological and geographical, edaphic, climatic factors, phase of the plant growth, cultivation technology, drying method etc. The results of the pharmacological studies of the extracts, summary fractions, and individual compounds of *Laurus nobilis* leaves characterize this type of raw materials as a perspective source for a more profound study. **Conclusion.** As the available open review data showed, the essential oil components, phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, etc), sesquiterpenic lactones of *Laurus nobilis* exhibit a diverse spectrum of pharmacological activity. Antimicrobial (widely), anti-virus, anti-inflammatory, anti-diabetic, and cytotoxic (anti-cancer) activities, established in extracts, certain fractions, and individual compounds of *Laurus* leaves compounds are perspective from the point of further studies and development of new treatment and preventive medicinal drugs.

**Keywords:** *Laurus nobilis*, essential oil, phenolic compounds, sesquiterpenic lactones, pharmacological activity

**Введение.** Лавр благородный – *Laurus nobilis* L. является источником растительного сырья (листья), которое используется как пряность и ароматическая приправа в процессе консервирования овощей, при приготовлении супов, мясных, рыбных блюд.

Листья лавра широко используются в традиционных блюдах народов не только Средиземноморских, но и многих других стран, где растение давно и успешно культивируется [1].

Одним из ведущих экспортеров лаврового листа является Турция (до 90% мирового экспорта). С 2008 г. по 2013 г. экспорт высушенного листа лавра Турцией увеличился с 6 000 тонн до 12 000 тонн (с 18,5 млн. до 30 млн. US\$) [2].

Крупнейшими импортёрами лаврового листа в мире являются Вьетнам, США, Россия, Польша и Германия [2].

На территории России лавр произрастает в юго-западных районах Краснодарского края, в Крыму.

В народной медицине народов разных стран листья лавра применяются при лечении диабета, заболеваний, вызванных грибковыми и бактериальными инфекциями. Извлечения из листьев лавра обладают противовоспалительными, успокаивающими, антиэпилептическими свойствами [3, 4]. Настой используется при различных желудочно-кишечных заболеваниях, а также при метеоризме в качестве ветрогонного средства [5].

Извлечения из листьев лавра благородного обладают противовоспалительной [6, 7], противоболевой [6], иммуностимулирующей [8], нейрозащитной [9], антихолинергической, антиокислительной, противоязвенной, антиконвульсантной, антимуtagenной, инсектицидной, антибактериальной, противовирусной, противогрибковой [7], ларвицидной [10] активностью.

В научной литературе описаны антибактериальные свойства водного [11], этанольного [12, 13] и метанольного извлечений [14]. Листья лавра входят в состав нескольких сборов [15] и лекарственных средств для лечения диабета [16, 17]. Извлечения из

этого сырья входят в состав биологически активных добавок к пище [18].

**Цель исследования** – обзор доступной литературы о выделении, идентификации, количественном определении биологически активных соединений листьев лавра благородного и установленных видах их фармакологической активности.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось с использованием информационно-поисковых (PubMed, CiteSeer, arXiv), библиотечных баз данных (eLibrary, Cyberleninka) и бесплатной социальной сети ResearchGate.

**Результаты и обсуждение.** В листьях лавра благородного были идентифицированы моно- и сесквитерпеноиды, фенольные и некоторые другие соединения [7].

1,8-Цинеол является главным компонентом эфирного масла листьев лавра (с содержанием 25-70%), собранных в разных регионах мира, например, в Турции [19, 20], Иране [21, 22], Китае [23], Тунисе [24], Марокко [25], Хорватии и Сербии [26], Италии [27], Франции [28], Португалии [29], Аргентине [30] и Бразилии [31].

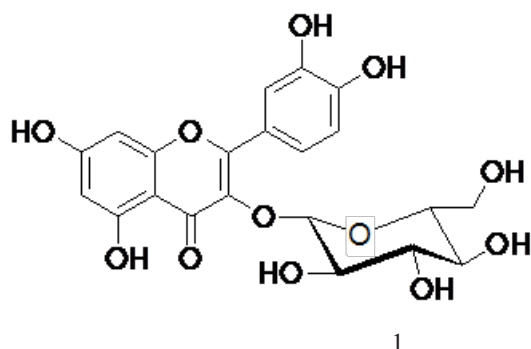
М. Riaz с соавторами исследовали химический состав эфирного масла, извлеченного из листьев лавра, произрастающего в Пакистане [32]. Выход масла был самым низким (0,13%) в марте и самым высоким (0,36%) в сентябре. Цинеол и эвгенол оказались главными компонентами во всех образцах, однако наблюдались различия в количественном содержании компонентов. К. Kevseroglu и др. изучили онтогенетическую и дневную изменчивость эфирного масла из листьев лавра, выращиваемого в Турции [33]. Исследования показали, что содержание эфирного масла в листьях незначительно варьировало в течение дня, но сезонная вариация была существенной. Самый высокий процент эфирного масла был установлен в августе (1,46%) и июле (1,33%), а самый низкий – в мае и сентябре (0,59% и 0,74%, соответственно). Авторами обнаружена положительная корреляция между содержанием эфирного масла в листьях и значениями температуры.

Наблюдаемые различия в составе эфирного масла и количественном содержании отдельных компонентов, по мнению некоторых исследователей, могут объясняться разными экологическими, климатическими, сезонными, генетическими и географическими факторами [34], а также различием видовых форм и хемотипов лавра, состоянием почвенного питания и т.д.

Антибактериальная активность эфирного масла из листьев лавра, изученная *in vitro* на трех бактериальных штаммах: *Staphylococcus aureus*, *St. intermedius* и *Klebsiella pneumonia*, проявлялась при минимальной ингибирующей концентрации от 0,01 до 1 мг/мл [25]. Цинеол, как известно, обладает сильным антибактериальным действием против *Staphylococcus aureus* [35]. Линалоол – алифатический спирт с выраженной антибактериальной активностью в отношении нескольких бактерий, таких как *Shigella sonnei*, *Sh. flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Listeria monocytogenes* [36]. У метилэвгенола и сабинена также установлена сильная антибактериальная активность [37], тогда как карвакрол проявил выраженную антибактериальную активность в отношении грамотрицательных бактерий [38]. Эти шесть основных липофильных веществ эфирного масла лавра в состоянии проникать через клеточные мембраны микроорганизмов, посредством разрушения полисахаридов, жирных кислот и фосфолипидов, входящих в их состав. Антибактериальная активность эфирного масла лавра описана в многочисленных исследованиях [39, 40].

Эфирное масло из листьев лавра (в концентрации 300 мг/мл) почти полностью ингибировало образование 3-нитротирозина (91%). 1,8-Цинеол оказался неактивным в этой модели. Это позволило авторам работы предположить, что данный эффект связан с другими летучими веществами листьев [41].

Противогрибковый потенциал эфирного масла из листьев лавра в отношении видов, принадлежащих к родам *Eurotium*, *Aspergillus* и *Penicillium*, был продемонстрирован M. Guynot с соавторами [42].



В листьях лавра, собранных в Греции, V. Parageorgiou с соавторами [34] в качестве главного фенольного компонента идентифицирован лютеолин (5). Фенольные кислоты – 3,4-дигидроксibenзойная (6), галловая (7), ванилиновая (8) и розмариновая (9) были обнаружены в низких концентрациях.

M. Muchuweti с соавторами [49] в извлечениях из

Эфирное масло из листьев показало антирадикальную активность (DPPH) со значением  $IC_{50} = 66,1$  мкг/мл. Ингибирование пролиферации линии раковых клеток K562 наблюдалось при значении  $IC_{50} = 95$  мкг/мл [43].

Болеутоляющее и противовоспалительное влияние эфирного масла листьев лавра в тестах на лабораторных животных (мыши, крысы) по активности сопоставимо с действием морфина и пироксикама [44].

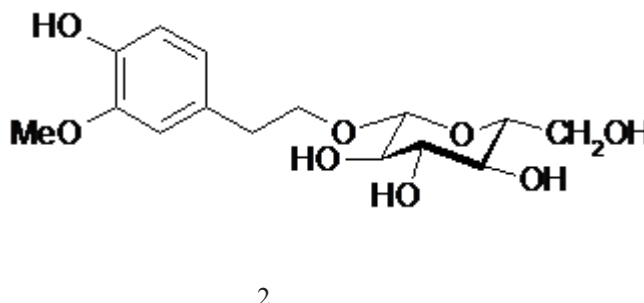
Эфирное масло листьев лавра использовалось как антиэпилептическое лекарственное средство в иранской традиционной медицине [45]. Оно защищало мышей от тонических приступов, индуцированных максимальным электрошоком и, особенно, пентилентетразолом. Компонентами, ответственными за эту активность, по мнению авторов, являлись метилэвгенол, эвгенол и пинен [45].

Фенольные соединения листьев дикорастущего и культивируемого лавра изучались в разных регионах его произрастания. Возрастающий интерес к этой группе природных соединений лавра связан не только с разнообразием идентифицированных структур, но и с актуальными видами фармакологической активности (антиокислительной и противораковой).

Авторами исследования *in vitro* [46] выявлена активность фенольных извлечений в отношении бактерий, грибов и некоторых линий опухолевых клеток человека (HeLa, MCF7, NCI-H460 и HCT15).

В исследовании H.W. Kang с соавторами [47] из этанольного извлечения листьев лавра был выделен и идентифицирован флавоноид изокверцитрин (1) (см. табл. 1), антиоксидантная активность которого оказалась выше, чем у бутилгидроксианизола, бутилгидрокситолуола и аскорбиновой кислоты.

Из метанольного извлечения свежих листьев лавра S. de Marino с соавторами [48] выделили несколько соединений, в том числе фенольный глюкозид (2) и флавоноиды (3 и 4). Наиболее активным ингибитором продукции оксида азота оказалось соединение 3 (см. табл. 1).



листьев лавра идентифицировали кофейную (10), феруловую (11) и ванилиновую (8) кислоту.

Исследование настоя листьев лавра, собранных в Италии [5], констатировало присутствие в нем кемпферол-3-О-глюкопиранозид (12); кемпферол-3-О-рамнопиранозид (13); кемпферол-3-О-(2'',4''-ди-Е-п-кумароил)-рамнозид (14);

кемпферол-3-О-арабинопиранозида (15); кемпферол-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозида (16); кверцетин-3-О-глюкопиранозида (17); кверцетин-3-О-рамнопиранозида (18); кверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозида]; 3'-метокси-кверцетин-3-О-[6-(рамнопиранозил) глюкопиранозида] (19); 3'-метоксикверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозида] (20); 3'-метоксикверцетин-3-О-глюкопиранозида (21); катехина (22); изовитексин 2''-рамнозида (23); циннамтаннина В1 (24).

Рутин (кверцетина 3-О-рутинозид) (25) был обнаружен в листьях растения методами ВЭЖХ [52] и СВЭЖХ (сверхпроизводительной жидкостной хроматографии) [55] и идентифицирован по времени удерживания на колонке, а также спектральным характеристикам в сравнении со стандартным образцом.

Листья лавра турецкого происхождения [50] содержали кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(3'',4''-Е-ди-*n*-кумароил)-рамнопиранозид (26), кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(3'',4''-ди-*Z*-*n*-кумароил)-рамнопиранозид (27), кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(3'',4''-ди-*E*-*n*-кумароил)-рамнопиранозид (28), кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(2''-Е,4''-Z-ди-*n*-кумароил)-рамнопиранозид (29), кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(2'',4''-ди-*E*-*n*-кумароил)-рамнопиранозид (30) и кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(2''-Z,4''-Е-ди-*n*-кумароил)-рамнопиранозид (31).

С. Рацифо с соавторами из метанольного извлечения листьев лавра, собранных в Италии, выделили и идентифицировали [51] гексозид 3,4-дигидроксibenзойной кислоты (32); 2', $\beta$ -дигидрокси- $\alpha$ , $\beta$ -дигидрохалкон- $\alpha$ -О-гексозид (33); 1-(2'-гидроксифенил)-1-гидрокси-фенилпропан- $\alpha$ -О-гексозид (34); гексозид кумаровой кислоты (35); 2'-гидрокси- $\alpha$ , $\beta$ -дигидрохалкон- $\alpha$ -О-гексозид (36); апигенин-6,8-ди-С-гексозид (37); апигенин-6-С-(2''-О-деоксигексозил)-гексозид (38); кверцетин-3-О-(6''-О-деоксигексозил)-гексозид (39); кемпферол-3-О-(6''-О-деоксигексозил)-гексозид (40); изорамнетин-3-О-(6''-О-деоксигексозил)-гексозид (41); циннамтаннин В1 (24); 8-С-гексозил апигенина (42); тетра-метокси-дигидрокверцетин-3-О-пентозид (43); кверцетин-3-О-гексозид (изомер 1 и 2) (44); кверцетин-3-О-пентозид (45); кемпферол-3-О-гексозид (46); кверцетин-3-О-деоксигексозид (47); изорамнетин-3-О-гексозид (48); кемпферол-3-О-пентозид (49); кемпферол-3-О-деоксигексозид (50).

Сравнительное изучение культивируемых и дикорастущих образцов листьев лавра, осуществленное в Португалии [52], идентифицировало присутствие гексозида эпикатехина (51), (+)-галлокатехина (52), (+)-катехина (53), (-)-эпикатехина (54), 6-С-глюкозида лютеолина (55), 8-С-глюкозида апигенина (56), 6-С-глюкозида апигенина (57), 3-О-глюкозида кверцетина (58), 3-О-рутинозида кемпферола (59), 3-О-глюкозида кемпферола (60) и некоторых других фенольных соединений.

Д.В. Muñiz-Márquez с коллегами [53] обнаружили в извлечениях из листьев лавра присутствие двух фенольных кислот – кумаровой (61) и 2-гидроксициннамовой (62).

Листья лавра, собранные в Крыму [54], в качестве доминирующего компонента флавановой природы содержали эпикатехин (54).

Таблица 1 – Фенольные соединения листьев лавра благородного

| № п/п | Название                                                      | Страна   | Источник |
|-------|---------------------------------------------------------------|----------|----------|
| 1     | 2                                                             | 3        | 4        |
| 1     | Изокверцитрин                                                 | Турция   | [47]     |
| 2     | Нет тривиального названия                                     | Италия   | [48]     |
| 3     | Кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(3'',4''-ди-Е-п-кумароил) рамнозид | Италия   | [48]     |
| 4     | Кемпферол-3-О- $\alpha$ -L-(2''-Е-п-кумароил) рамнозид        | Турция   | [50]     |
| 5     | Лютеолин                                                      | Италия   | [48]     |
| 6     | 3,4-Дигидроксibenзойная кислота                               | Греция   | [34]     |
| 7     | Галловая кислота                                              | Греция   | [34]     |
|       |                                                               | Россия   | [61]     |
| 8     | Ванилиновая кислота                                           | Греция   | [34]     |
|       |                                                               | Зимбабве | [49]     |
| 9     | Розмариновая кислота                                          | Греция   | [34]     |
| 10    | Кофейная кислота                                              | Зимбабве | [49]     |
| 11    | Феруловая кислота                                             |          |          |
| 12    | Кемпферол-3-О-глюкопиранозид                                  |          |          |
| 13    | Кемпферол-3-О-рамнопиранозид                                  |          |          |
| 14    | Кемпферол-3-О-(2'',4''-ди-Е-п-кумароил)-рамнозид              |          |          |
| 15    | Кемпферол-3-О-арабинопиранозид                                |          |          |
| 16    | Кемпферол-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид]           |          |          |

Продолжение таблицы 1

| №<br>п/п | Название                                                               | Страна     | Источник |
|----------|------------------------------------------------------------------------|------------|----------|
| 1        | 2                                                                      | 3          | 4        |
| 17       | Кверцетин-3-О-глюкопиранозид                                           | Италия     | [5]      |
| 18       | Кверцетин-3-О-рамнопиранозид                                           |            |          |
| 19       | Кверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид]                    |            |          |
| 20       | 3'-Метоксикверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид]          |            |          |
| 21       | 3'-Метоксикверцетин-3-О-глюкопиранозид                                 |            |          |
| 22       | Катехин                                                                | Италия     | [5]      |
|          |                                                                        | Россия     | [54]     |
| 23       | Изовитексин-2''-рамнозил                                               | Италия     | [5]      |
| 24       | Циннамтанин В1                                                         | Италия     | [5]      |
|          |                                                                        | Италия     | [51]     |
|          |                                                                        | Китай      | [55]     |
| 25       | Рутин (кверцетина 3-О-рутинозид)                                       | Португалия | [52]     |
| 26       | Кемпферол-3-О-α-L-(3''-Z,4''-Е-ди- <i>n</i> -кумароил)-рамнопиранозид  | Турция     | [50]     |
| 27       | Кемпферол -3-О-α-L-(3'',4''-ди- <i>Z-n</i> -кумароил)-рамнопиранозид   |            |          |
| 28       | Кемпферол -3-О-α-L-(3'',4''-ди- <i>E-n</i> -кумароил)-рамнопиранозид   |            |          |
| 29       | Кемпферол -3-О-α-L-(2''-Е,4''-Z-ди- <i>n</i> -кумароил)-рамнопиранозид |            |          |
| 30       | Кемпферол -3-О-α-L-(2'',4''-ди- <i>E-n</i> -кумароил)-рамнопиранозид   |            |          |
| 31       | Кемпферол -3-О-α-L-(2''-Z,4''-Е-ди- <i>n</i> -кумароил)-рамнопиранозид |            |          |
| 32       | 3,4-Дигидроксibenзойной кислоты гексозид                               | Италия     | [51]     |
| 33       | 2',β -Дигидрокси-α,β-дигидрохалкона-α-О-гексозид                       |            |          |
| 34       | 1-(2'-Гидроксифенил)-1-гидроксифенилпропан-α-О-гексозид                |            |          |
| 35       | Кумаровой кислоты гексозид                                             |            |          |
| 36       | 2'-Гидрокси-α,β-дигидрохалкон-α-О-гексозид                             |            |          |
| 37       | Апигенин-6,8-ди-С-гексозид                                             |            |          |
| 38       | Апигенин-6-С-(2''-О-деоксигексозил)-гексозид                           |            |          |
| 39       | Кверцетин-3-О-(6''-О-деоксигексозил)-гексозид                          |            |          |
| 40       | Кемпферол-3-О-(6''-О-деоксигексозил)-гексозид                          |            |          |
| 41       | Изорафнетин-3-О-(6''-О-деоксигексозил)-гексозид                        |            |          |
| 42       | Апигенин 8-С-гексозид                                                  |            |          |
| 43       | Тетра-метокси-дигидрокверцетин-3-О-пентозид                            |            |          |
| 44       | Кверцетин-3-О-гексозид                                                 |            |          |
| 45       | Кверцетин-3-О-пентозид                                                 |            |          |
| 46       | Кемпферол-3-О-гексозид                                                 |            |          |
| 47       | Кверцетин-3-О-деоксигексозид                                           |            |          |
| 48       | Изорафнетин-3-О-гексозид                                               |            |          |
| 49       | Кемпферол-3-О-пентозид                                                 |            |          |
| 50       | Кемпферол-3-О-деоксигексозид                                           |            |          |
| 51       | Эпикатехина гексозид                                                   | Португалия | [52]     |
| 52       | (+)-Галлокатехин                                                       |            | [52; 56] |
| 53       | (+)-Катехин                                                            |            |          |
| 54       | (-)-Эпикатехин                                                         |            | [52]     |
| 55       | Лютеолина 6-С-глюкозид                                                 |            |          |
| 56       | Апигенина 8-С-глюкозид                                                 |            |          |
| 57       | Апигенина 6-С-глюкозид                                                 |            |          |
| 58       | Кверцетина 3-О-глюкозид                                                |            |          |
| 59       | Кемпферола 3-О-рутинозид                                               |            |          |
| 60       | Кемпферола 3-О-глюкозид                                                |            |          |
| 61       | Кумаровая кислота                                                      | Мексика    | [53]     |
| 62       | 2-Гидкорсициннамовая кислота                                           |            |          |

По данным М. Škerget с соавторами [57] в метанольных извлечениях из листьев лавра, приобретенных в Словении, сумма фенольных соединений составила 99,7 г/кг (в пересчете на галловую кислоту).

Исследование настоя из этого сырья, выполненное группой авторов [5], показало, что содержание производных кемпферола и кверцетина в нем достигает 0,31±0,01 мг/100 мл и 2,11±0,01 мг/100 мл, соответственно. В расчете на 200 мл настоя это приблизительно 5,0 мг (в сумме).

М. Lu с соавторами [55] исследовали содержание флавоноидов и фенольных кислот в этанольных экстрактах лавровых листьев растений, выращенных в Китае. Содержание фенольных кислот в пересчете на сухой вес составило 474,1±12,7 мг/г, рутина (25) – 929,4±19,3 мг/г и неидентифицированных флавоноидов – 2138,2±42,7 мг/г.

Фенольный профиль листьев лавра, собранных на материке, Азорских островах и Мадейре (Португалия) был проанализирован А. Vinha с соавторами [56] (см. табл. 2).

**Таблица 2 – Количественное содержание разных групп фенольных соединений в листьях лавра благородного**

| Соединения                                                   | Извлечения |                                  |            |
|--------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------|------------|
|                                                              | Водное     | Спиртоводное (вода-этанол (1:1)) | Спиртовое  |
| Фенольные соединения, мг/г (в пересчете на галловую кислоту) | 14,37±0,79 | 43,03±0,35                       | 31,09±0,31 |
| Флавоноиды, мг/г (в пересчете на эпикатехин)                 | 14,12±0,93 | 30,15±0,25                       | 20,88±0,88 |
| (+)-Катехин                                                  | 0,41*      | 0,58*                            | 0,04*      |
| (-)-Эпикатехин                                               | 0,99*      | 3,44*                            | 0,67*      |
| Сумма мономеров                                              | 1,40*      | 4,02*                            | 0,71*      |
| Димерные проантоцианидины                                    | 1,49*      | 16,97*                           | 5,25*      |
| Тримерные проантоцианидины 1                                 | 0,48*      | 1,24*                            | 0,32*      |
| Тримерные проантоцианидины 2                                 | 1,73*      | 5,05*                            | 2,46*      |
| Тетрамерные проантоцианидины                                 | 1,02*      | 1,16*                            | 0,32*      |
| Сумма флаван-3-олов                                          | 6,12*      | 28,44*                           | 9,06*      |

\* – концентрации даны в мг/г в пересчете на эпикатехин и сухой вес

Представленные данные показывают, что листья лавра благородного являются ценным источником фенольных соединений, таких как фенольные кислоты и флавоноиды. В сумме их содержание в листьях может достигать до 99,7 г/кг (в пересчете на галловую кислоту).

Количественное содержание разных групп фенольных веществ варьирует в зависимости от места сбора, источника сырья (культивируемые или дикорастущие растения), времени (фазы) его заготовки, способа сушки и извлечения из сырья и т.д.

Сесквитерпеновые лактоны, выделенные из листьев *Laurus nobilis*, представлены в таблице 3. Эти соединения обладают разными фармакологическими активностями: антибактериальной, противогрибковой [14], антидиабетической, противовоспалительной (ингибируют производство NO), гепатопротективной [58], нейрозащитной [44], ингибируют поглощение спирта, повышают активность печеночной глутатион-S-трансферазы, цитотоксичны и индуцируют апоптоз [59].

Н. Hibasami с соавторами [60] установили, что сесквитерпеновые лактоны лавра – костунолид (4) и залузанин D (26) показывают сильное рост-ингибирующее влияние в отношении клеток миелоидного лейкоза (HL-60) человека и вызывают их апоптоз.

Авторы этой работы, как и большинство других исследователей, считают, что α-метилден-γ-бутиролактонная часть сесквитерпеновых лактонов – необходимое условие для проявления цитотоксической (противоопухолевой) активности.

Н. Matsuda и др. обнаружили, что костунолид (4) также проявляет гастропротективное действие [61].

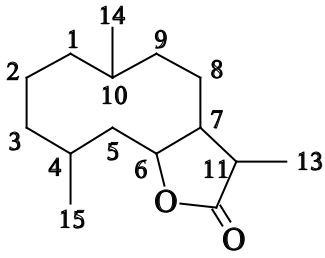
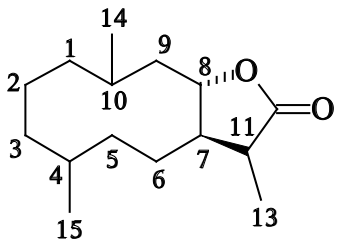
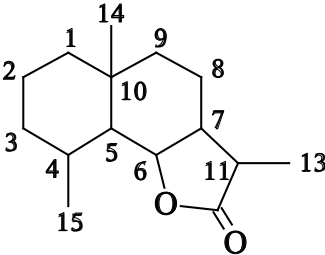
М. Yoshikawa с соавторами показали, что α-метилден-γ-бутиролактонная часть обуславливает способность некоторых сесквитерпеновых лактонов из листьев лавра ингибировать повышение содержания этанола в крови [62]. N. Uchiyama с коллегами установили, что несколько сесквитерпеновых лактонов этого растения проявляют трипановидную активность, благодаря образованию ковалентной связи между их α,β-ненасыщенной γ-лактонной частью и нуклеофилами [63].

Костунолид (4) и дегидрокостус лактон (24) в эксперименте показали ингибирующую активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv с минимальными ингибирующими концентрациями 6,25 мг/л и 12,5 мг/л, соответственно. Активность в отношении лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M. tuberculosis* смеси лактонов была выше, чем для индивидуальных соединений [64].

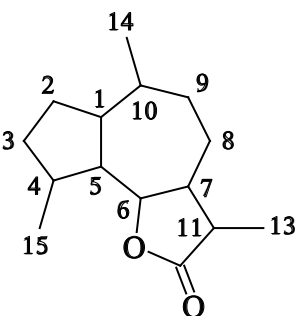
10 сесквитерпеновых лактонов: рейнозин (21), гидропероксид магнолиалида (19), 1 $\beta$ ,2 $\beta$ -дигидрокси-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ H-эвдесма-4(15),11(13)-диен-12,6-олид (14), сантамарин (22), магнолиалид (18), 3 $\alpha$ -пероксиармефолин (20), 13-дегидросантонин (13), тубифе-

рин (23), ангидропероксикостунолид (1), люцентолид (5) были выделены Е. Julianti с соавторами из листьев лавра. Эти соединения показали различные уровни цитотоксичности по отношению к лейкозным клеткам K562 [65].

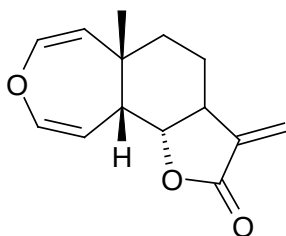
Таблица 3 – Сесквитерпеновые лактоны, обнаруженные в лавре благородном

| № п/п                                                                               | Тривиальное название      | Положение заместителей                                                                                       | Источник        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Гермакран-12,6-олиды                                                                |                           |                                                                                                              |                 |
|    |                           |                                                                                                              |                 |
| 1.                                                                                  | Ангидропероксикостунолид  | 1-оксо; 4(5),11(13),10(14)-триен; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                                                  | [65]            |
| 2.                                                                                  | Артеморин                 | 1(10),4(5),11(13)-триен; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                                                           | [66, 67]        |
| 3.                                                                                  | Верлоторин                | 1 $\beta$ -ООН; 4(5),11(13),10(14)-триен; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                                          | [67]            |
| 4.                                                                                  | Костунолид                | 1 $\beta$ -ОН; 4(5),11(13),10(14)-триен; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                                           | [59, 62, 66-69] |
| 5.                                                                                  | Люцентолид                | 1 $\alpha$ -ОН; 4(5),11(13),10(14)-триен; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                                          | [65]            |
| Гермакран-12,8-олиды                                                                |                           |                                                                                                              |                 |
|  |                           |                                                                                                              |                 |
| 6.                                                                                  | Дезацетиллауренобиолид    | 6 $\alpha$ -H; 1(10),4(5),11(13)-триен; 7 $\alpha$ ,8 $\beta$ – H                                            | [14, 67]        |
| Эвдесман-12,6-олиды                                                                 |                           |                                                                                                              |                 |
|  |                           |                                                                                                              |                 |
| 7.                                                                                  | Без тривиального названия | 1,2 $\alpha$ /3,4 $\alpha$ -диэпоксид; 11-ен; 4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H | [65]            |
| 8.                                                                                  | Без тривиального названия | 1 $\alpha$ ,2 $\beta$ -диОН; 3,11-диен; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H                   |                 |
| 9.                                                                                  | Без тривиального названия | 1 $\beta$ -ОН; 4 $\alpha$ -ОСН <sub>3</sub> ; 11-ен; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H      |                 |
| 10.                                                                                 | Без тривиального названия | 1 $\beta$ ,4 $\beta$ -диОН; 11-ен; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H                        |                 |
| 11.                                                                                 | Без тривиального названия | 1 $\beta$ -ОН,2 $\beta$ -ОАс; 4,11-диен; 5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H                             |                 |
| 12.                                                                                 | 10-эпигазаниолид          | 1,3,11(13)-триен; 5 $\alpha$ ,10 $\beta$ – H                                                                 | [59]            |
| 13.                                                                                 | 13-дегидросантонин        | 3-оксо; 1,4,11(13)-триен; 4 $\alpha$ -СН <sub>3</sub> ; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                | [65]            |
| 14.                                                                                 | Без тривиального названия | 1 $\beta$ ,2 $\beta$ -диОН; 4(15),11(13)-диен; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -H                          | [68]            |
| 15.                                                                                 | Без тривиального названия | 1 $\beta$ ,15-диОН; 3,11(13)-диен; 5 $\alpha$ H,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                                   |                 |

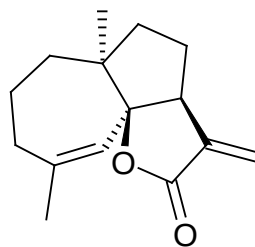
Продолжение таблицы 3

| № п/п                                                                             | Тривиальное название                | Положение заместителей                                                                       | Источник             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 16.                                                                               | Без тривиального названия           | 3 $\alpha$ -AcO; 1,4(15),11(13)-триен; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H     | [62]                 |
| 17.                                                                               | Газаниолид                          | 1,3,11(13)-триен;10 $\alpha$ -H                                                              | [59]                 |
| 18.                                                                               | Магнолиалид                         | 1 $\beta$ -OH; 4(5),11(13)-диен; 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H           | [65]                 |
| 19.                                                                               | Гидропероксид магнолиалида          | 1 $\beta$ -OH; 4 $\alpha$ -OOH; 4(15),11(13)-диен; 7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                | [65]                 |
| 20.                                                                               | 3 $\alpha$ -пероксиармефолин        | 1 $\beta$ -OH; 3 $\alpha$ -OOH; 4(5),11(13)-диен; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H      | [65]                 |
| 21.                                                                               | Рейнозин                            | 1 $\beta$ -OH; 4(15),11(13)-диен; 5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                     | [59, 62, 67-69]      |
| 22.                                                                               | Сантамарин                          | 1 $\beta$ -OH; 3,11(13)-диен; 5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                         | [59, 62, 65, 67, 68] |
| 23.                                                                               | Тубиферин                           | 3-оксо; 1,11(13)-диен; 4 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H          | [65]                 |
| Гвайан-12,6-олиды                                                                 |                                     |                                                                                              |                      |
|  |                                     |                                                                                              |                      |
| 24.                                                                               | Дегидрокостус лактон                | 4(15),11(13),10(14)-триен; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                 | [69]                 |
| 25.                                                                               | 3 $\beta$ –хлордегидрокостус лактон | 3 $\beta$ -Cl; 4(15),11(13),10(14)-триен; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H  | [62, 66, 69]         |
| 26.                                                                               | Залузанин D                         | 3 $\beta$ -OAc; 4(15),11(13),10(14)-триен; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H | [62, 69]             |
| 27.                                                                               | Залузанин C                         | 3 $\beta$ -OH; 4(15),11(13),10(14)-триен; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H  | [69]                 |
| 28.                                                                               | Эремантин                           | 4(15),11(13),9(10)-триен; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H                  | [69]                 |

## Другие типы лактонов



Спирофолид [59]



Без тривиального названия [66].

Таким образом, листья лавра благородного содержат значительное количество эфирного масла, фенольных соединений и сесквитерпеновых лактонов разнообразных как по структуре, так и по выявленным у них видам фармакологической активности.

**Заключение.** Как показали, представленные в обзоре, данные научной литературы, компоненты эфирного масла, фенольные соединения и сесквитерпеновые лактоны лавра благородного являются ведущими группами действующих веществ. Исследования разных ученых и исследовательских коллективов установили различия в качественном составе и количественном содержании этих биологически активных веществ (БАВ) лавра. По мнению некоторых исследователей, указанная вариация может об-

ясняться разными экологическими, климатическими, сезонными, генетическими и географическими факторами [34], а также различием видовых форм и хемотипов растений лавра, состоянием почвенного питания и т.д.

Фармакологические исследования установили разнообразный спектр активности БАВ листьев лавра благородного. Антибактериальная (в широком смысле), противовирусная, противовоспалительная, антидиабетическая и цитотоксическая (противораковая) активности, обнаруженные у извлечений и индивидуальных соединений листьев лавра, являются перспективными с точки зрения будущих исследований и разработки новых лечебно-профилактических и лекарственных средств.

**Introduction.** *Laurus nobilis* L. is a source of a plant raw material (leaves) which is used as a spice and aromatic seasoning in vegetables preservation, for soups, meat and fish dishes.

*Laurus nobilis* leaves are widely used in traditional dishes of not only Mediterranean peoples but of many other countries, where the plant has been successfully cultivated for a long time [1].

Turkey is one of the leading exporters of laurel leaves (up to 90% of world export). From 2008 to 2013 export of dried laurel leaves increased from 6 000 tons to 12 000 tons (from \$18.5 mln to \$30 mln) [2].

The biggest importers of laurel leaves are Vietnam, the USA, Russia, Poland, and Germany [2].

In Russia *Laurus nobilis* grows in the South-Western regions of Krasnodar Krai and in Crimea.

In folk medicine of different countries, *Laurus nobilis* leaves are applied for diabetes treatment, as well as diseases evoked by fungous and bacterial infections. Extracts from *Laurus nobilis* leaves have anti-inflammatory, sedative, anti-epileptic properties [3, 4]. Its infusion is used for treatment of different intestinal diseases, tympanism as a carminative agent [5].

Extracts from *Laurus nobilis* leaves have anti-inflammatory [6, 7], analgesic [6], immunostimulatory [8], neuroprotective [9], anti-cholinergic, anti-oxidant, anti-ulcer, anticonvulsant, antimutagenic, insecticide, antibacterial, antiviral, antifungal [7], larvicidal [10] activity.

There are properties of water [11], ethanol [12, 13], and methanol extracts [14] described in scientific literature. The laurel leaves are included in several teas [15] and medicinal drugs for diabetes treatment [16, 17]. Extracts from these raw materials are found in the biologically active diet supplements [18].

The aim of the study is the review of available literature about isolation, identification, quantitative determination of biologically active compounds of the *Laurus nobilis* leaves in the established species and their pharmacological activity.

**Materials and methods.** The study was carried out using searching (*PubMed*, *CiteSeer*, *arXiv*), library databases (*eLibrary*, *Cyberleninka*), and *ResearchGate* free social network.

**Results and discussion.** There were mono- and sesquiterpenoids, phenolic and some other compounds were identified in *Laurus nobilis* leaves [7].

1,8-cineole is the main component of the essential oil of laurel leaves (25-70%) gathered in different regions of world for example in Turkey [19, 20], Iran [21, 22], China [23], Tunisia [24], Morocco [25], Croatia and Serbia [26], Italy [27], France [28], Portugal [29], Argentina [30] and Brazil [31].

M. Riaz with co-authors studied for a chemical composition of the essential oil extracted from laurel leaves which grow in Pakistan [32]. The oil efficiency was the lowest (0.13%) in March and the highest (0.36%) in September. Cineole and eugenol were the principal components in all the samples, however there were differences in quantitative content of components. K. Kevseroglu

and others studied for an ontogenetic and day variability of the essential oil from laurel leaves which is cultivated in Turkey [33]. The studies showed that essential oil content in leaves varied insignificantly within a day but seasonal variation was more significant. The highest percentage of the essential oil was established in August (1.46%) and July (1.33%) and the lowest was in May and September (0.59 and 0.74% respectively). The authors found a positive correlation between essential oil content in leaves and temperature values.

According to some researchers, the values observed in essential oil composition and quantitative content of certain components can be explained by different ecological, climatic, seasonal, genetic, and geographic factors [34], as well as differences of species and chemotypes of *Laurus* plants, conditions of soil feeding etc.

Antibacterial activity of essential oil from *Laurus nobilis* leaves, studied in vitro on three bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *St. intermedius* и *Klebsiella pneumonia*, exhibited in minimal inhibiting concentration from 0.01 to 1 mg/ml [25]. As we know, cineol has a strong antibacterial action against *Staphylococcus aureus* [35]. Linalool is an aliphatic alcohol with exhibited anti-bacterial activity against several bacteria such as *Shigella sonnei*, *Sh. flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Listeria monocytogenes* [36]. Methyleugenol and sabinen as well exhibited strong antibacterial activity [37], while carvacrol exhibited an antibacterial activity against gram-negative bacteria [38]. These six basic lipophilic substances of the *Laurus* essential oil are able to penetrate through the cell membranes of microorganisms by means of polysaccharides, fatty acids, and phospholipids destruction which compose them. Antibacterial activity of the essential oil of *Laurus* is described in a lot of researches [39, 40].

Essential oil from *Laurus* leaves (in concentration 300 mg/ml) almost entirely inhibited the formation of 3-nitrotyrosine (91%). 1,8-cineole turned out to be ineffective in this model. This allowed authors to assume that this effect is connected with other volatile substances of the leaves [41].

Antifungal potential of the essential oil from laurel leaves in relation the species of *Eurotium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera was showed by M. Guynot with co-authors [42].

Essential oil from the leaves showed antiradical activity (DPPH) with IC<sub>50</sub> value of 66.1 µg/ml. Inhibition of proliferation of cancer cells line K562 was observed at IC<sub>50</sub> = 95 µg/ml [43].

Anesthetic and anti-inflammatory influence of essential oil and laurel leaves in the tests on laboratory animals (mice, rats) for activity was comparable with morphine and piroxicam action [44].

Essential oil of laurel leaves were used as anti-epileptic agent in Iranian traditional medicine [45]. It protected mice from chronical attacks, induced by maximum electric shock, especially with pentylenetetrazol. Methyleugenol, eugenolom and pinen were responsible for this activity according to the authors' opinion [45].

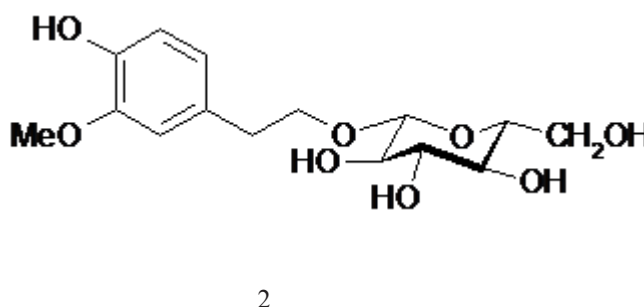
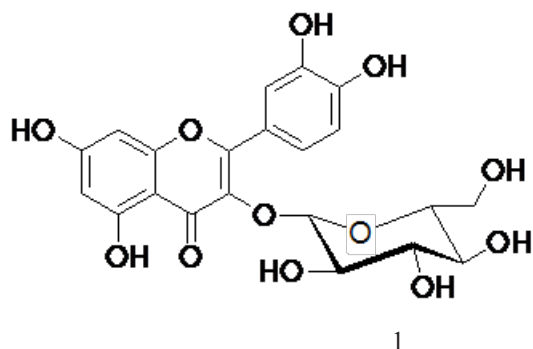
Growing interest to this group of natural compounds of *Laurus* is connected not only with the diversity of the identified structure but also with the timely types of pharmacological activity (antioxidant and anticancer).

The authors of in vitro study [46] have found out the activity of phenolic extracts against bacteria, fungi, and some lines of tumorous cells of human (HeLa, MCF7, NCI-H460 и HCT15).

In the study of H.W. Kang with co-authors [47] they

have isolated and identified flavonoid isoquercitrin (1) from the ethanol extract from laurel leaf (table 1). Its antioxidant activity was higher than butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluene, and ascorbic acid had.

S. de Marino with co-authors [48] have isolated several compounds from the methanol extract of fresh laurel leaves including phenolic glycoside (2) and flavonoids (3 and 4). The compound 3 was the most active inhibitor of nitrogen oxide production (table 1).



V. Papageorgiou with co-authors identified luteolin (5) as the main phenolic components in laurel leaves gathered in Greece [34]. Phenolic acids – 3,4-dihydroxybenzoic (6), gallic (7), vanillic (8), and rosmarinic (9) were found in low concentrations.

M. Muchuweti with co-authors [49] have identified caffeic (10), ferulic (11) and vanillic (8) acids in the extracts from the laurel leaves.

Studies for the infusion of laurel leaves gathered in Italy [5] stated the presence of kaempferol-3-O-glucopyranoside (12); kaempferol-3-O-rhamnopyranoside (13); kaempferol-3-O-(2'',4''-di-E-*n*-coumaroyl)-rhamnoside (14); kaempferol-3-O-arabinopyranoside (15); kaempferol-3-O-[6-O-(rhamnopyranosil) glucopyranoside]; 3'-methoxy-quercetin-3-O-[6-(rhamnopyranosil) glucopyranoside] (19); 3'-methoxyquercetin-3-O-[6-O-(rhamnopyranosil) glucopyranoside] (20); 3'-methoxyquercetin-3-O-glucopyranoside (21); catechine (22); isovitexin 2''-rhamnoside (23); cinnamtannin B1 (24).

Rutin (quercetin 3-O-rutinoside) (25) was detected in the leaves of the plant by the methods of HPLC [52], and UPLC (performance liquid chromatography) [55] and identified by retention time on the column and spectral characteristics in comparison with the standard sample.

Laurel leaves from Turkey [50] had kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3''-Z, 4''-E-di-*n*-coumaroyl)-rhamnopyranoside (26), kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3'', 4''-di-Z-*n*-coumaroyl)-rhamnopyranoside (27), kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3'', 4''-di-E-*n*-coumaroyl)-rhamnopyranoside (28), kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2''-E,4''-Z-di-*n*-coumaroyl)-rhamnopyranoside (29), kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2'',4''-di-E-*n*-coumaroyl)-rhamnopyranoside (30), and kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2''-Z,4''-E-di-*n*-coumaroyl)-rhamnopyranoside (31).

S. Pacifico with co-authors have identified the following substances from the methanol extracts from laurel leaves gathered in Italy [51]: hexoside 3,4-dihydroxybenzoic acid (32); 2', $\beta$ -dihydroxy- $\alpha,\beta$ -dihydrochalcone- $\alpha$ -O-hexoside (33); 1-(2'-hydroxyphenyl)-1-hydroxyphenylpropan- $\alpha$ -O-hexoside (34); hexoside of coumaric acid (35); 2'-hydroxy- $\alpha,\beta$ -dihydrochalcone- $\alpha$ -O-hexoside (36); apigenin-6,8-di-C-hexoside (37); apigenin-6-C-(2''-O-deoxyhexosil)-hexoside (38); quercetin-3-O-(6''-O-deoxyhexosil)-hexoside (39); kaempferol-3-O-(6''-O-deoxyhexosil)-hexoside (40); isorhamnetin-3-O-(6''-O-deoxyhexosil)-hexoside (41); cinnamtannin B1 (24); 8-C-hexosil apigenin (42); tetra-methoxy-dihydroquercetin-3-O-pentose (43); kaempferol-3-O-hexoside (isomer 1 and 2) (44); quercetin-3-O-pentose (45); kaempferol-3-O-hexoside (46); quercetin-3-O-deoxyhexoside (47); isorhamnetin-3-O-hexoside (48); kaempferol-3-O-pentose (49); kaempferol-3-O-deoxyhexoside (50).

Comparative study of cultivated and wild-growing samples of laurel leaves which took place in Portugal [52] identified the presence of hexoside epicatechin (51), (+)-gallocatechin (52), (+)-catechin (53), (-)-epicatechin (54), 6-C-luteoline glucoside (55), 8-C-apigenin glucoside (56), 6-C-apigenin glucoside (57), 3-O-quercetin glucoside (58), 3-O-kaempferol rutinoside (59), 3-O-kaempferol glucoside (60) and several other phenolic compounds.

D.B. Muñiz-Márquez with his colleagues [53] have found the presence of two phenolic acids in extracts from laurel leaves: coumaric (61) and 2-hydroxycinnamic acids (62).

Laurel leaves gathered in Crimea contained epicatechin as a dominating component of a flavonic nature (54).

Table 1 – Phenolic compounds of *Laurus nobilis* leaves

| No | Name                                                                                | Country  | Source |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------|
| 1  | 2                                                                                   | 4        | 5      |
| 1  | Isoquercitrin                                                                       | Turkey   | [47]   |
| 2  | No trivial name                                                                     | Italy    | [48]   |
| 3  | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3'',4''-di-E- <i>n</i> -coumaroyl) rhamnoside          | Italy    | [48]   |
|    |                                                                                     | Turkey   | [50]   |
| 4  | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2''-E- <i>n</i> -coumaroyl) rhamnoside                 | Italy    | [48]   |
| 5  | Luteolin                                                                            | Greece   | [34]   |
| 6  | 3,4-dihydroxybenzoic acid                                                           |          |        |
| 7  | Gallic acid                                                                         | Greece   | [34]   |
|    |                                                                                     | Russia   | [61]   |
| 8  | Vanillic acid                                                                       | Greece   | [34]   |
|    |                                                                                     | Zimbabwe | [49]   |
| 9  | Rosmarinic acid                                                                     | Greece   | [34]   |
| 10 | Caffeic acid                                                                        | Zimbabwe | [49]   |
| 11 | Ferulic acid                                                                        |          |        |
| 12 | Kaempferol-3-O-glucopyranoside                                                      | Italy    | [5]    |
| 13 | Kaempferol-3-O-rhamnopyranoside                                                     |          |        |
| 14 | Kaempferol-3-O-(2'',4''-di-E- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnoside                       |          |        |
| 15 | Kaempferol-3-O-arabinopyranoside                                                    |          |        |
| 16 | Kaempferol-3-O-[6-O-(rhamnopyranosil) glucopyranoside]                              |          |        |
| 17 | Quercetin-3-O-glucopyranoside                                                       |          |        |
| 18 | Quercetin-3-O-rhamnopyranoside                                                      |          |        |
| 19 | Quercetin-3-O-[6-O-(rhamnopyranosil) glucopyranoside]                               |          |        |
| 20 | 3'-metoxiquercetin-3-O-[6-O-(rhamnopyranosil) glucopyranoside]                      |          |        |
| 21 | 3'-metoxiquercetin-3-O-glucopyranoside                                              |          |        |
| 22 | Catechin                                                                            | Italy    | [5]    |
|    |                                                                                     | Russia   | [54]   |
| 23 | Isovitexin-2''-rhamnosyl                                                            | Italy    | [5]    |
|    |                                                                                     | Italy    | [5]    |
| 24 | Cinnamtanin B1                                                                      | Italy    | [51]   |
|    |                                                                                     | China    | [55]   |
| 25 | Rutin (quercetin 3-O-rutinoside)                                                    | Portugal | [52]   |
| 26 | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3''-Z,4''-E-di- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnopyranoside  | Turkey   | [50]   |
| 27 | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3'',4''-di-Z- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnopyranoside    |          |        |
| 28 | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(3'',4''-di-E- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnopyranoside    |          |        |
| 29 | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2''-E,4''-Z-di- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnopyranoside  |          |        |
| 30 | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2'',4''-di-E- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnopyranoside    |          |        |
| 31 | Kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-(2''-Z,4''-E-di- <i>n</i> -coumaroyl)-rhamnopyranoside  |          |        |
| 32 | 3,4-dihydroxybenzoic acid hexoside                                                  | Italy    | [51]   |
| 33 | 2', $\beta$ -dihydroxy- $\alpha$ , $\beta$ -dihydroxychalcone- $\alpha$ -O-hexoside |          |        |
| 34 | 1-(2'-hydroxyphenyl)-1-hydroxyphenylpropan- $\alpha$ -O-hexoside                    |          |        |
| 35 | Coumaric acid hexoside                                                              |          |        |
| 36 | 2'-hydroxy- $\alpha$ , $\beta$ -dihydrochalcone- $\alpha$ -O-hexoside               |          |        |
| 37 | Apigenin-6,8-di-C-hexoside                                                          |          |        |
| 38 | Apigenin-6-C-(2''-O-deoxyhexosyl)-hexoside                                          |          |        |
| 39 | Quercetin-3-O-(6''-O-deoxyhexosyl)-hexoside                                         |          |        |
| 40 | Kaempferol-3-O-(6''-O-deoxyhexosyl)-hexoside                                        |          |        |
| 41 | Isorhamnetin-3-O-(6''-O-deoxyhexosyl)-hexoside                                      |          |        |
| 42 | Apigenin-8-C-hexoside                                                               |          |        |
| 43 | Tetra-methoxy-dihydroquercetin-3-O-pentoside                                        |          |        |
| 44 | Quercetin-3-O-hexoside                                                              |          |        |
| 45 | Quercetin-3-O-pentoside                                                             |          |        |

Table 1 continued

| No | Name                         | Country  | Source   |
|----|------------------------------|----------|----------|
| 1  | 2                            | 4        | 5        |
| 46 | Kaempferol-3-O-hexoside      |          |          |
| 47 | Quercetin-3-O-deoxyhexoside  |          |          |
| 48 | Isorhamnetin-3-O-hexoside    |          |          |
| 49 | Kaempferol-3-O-pentoside     |          |          |
| 50 | Kaempferol-3-O-deoxyhexoside |          |          |
| 51 | Epicatechin hexoside         | Portugal | [52]     |
| 52 | (+)-Gallocatechin            |          | [52; 56] |
| 53 | (+)-Catechin                 |          |          |
| 54 | (-)-Epicatechin              |          | [52]     |
| 55 | Luteolin-6-C-glucosid        |          |          |
| 56 | Apigenin 8-C-glucosid        |          |          |
| 57 | Apigenin 6-C-glucosid        |          |          |
| 58 | Quercetin 3-O-glucosid       |          |          |
| 59 | Kaempferol 3-O-rutinoside    |          |          |
| 60 | Kaempferol 3-O-glucoside     |          |          |
| 61 | Coumaric acid                | Mexico   | [53]     |
| 62 | 2-hydycorsicinnamic acid     |          |          |

According to M.Škerget with co-authors [57] in methanol extracts from laurel leaves gathered in Slovenia phenolic compounds amounted to 99.7 g/kg (in terms of gallic acid).

The study for an infusion from this raw material, made by a group of authors [5], showed that the content of kaempferol and quercetin derivatives in it amounts to 0.31±0.02 mg/100 ml and 2.11±0.01 mg/100ml respectively. In terms on 200 ml of decoction it is 5.0 mg (total).

M. Lu with co-authors [55] studied content of flavonoids and phenolic acids in ethanol extracts of laurel leaves of plants cultivated in China. The content of phenolic acids in terms of a dry weight amounted to 475.1±12.7 mg/g, rutin (**25**) – 929.4±19.3 mg/g and undefined flavonoids – 2138.2±42.7 mg/g.

Phenolic profile of *Laurus* leaves gathered on a continent, the Azores and Madeira (Portugal) was analyzed by A. Vinha with co-authors [56] (table 2).

Table 2 – Quantitative content of different groups of phenolic compounds in *Laurus nobilis* leaves

| Compounds                                        | Extracts   |                                      |            |
|--------------------------------------------------|------------|--------------------------------------|------------|
|                                                  | Water      | Water-alcohol<br>(water-ethanol 1:1) | Alcohol    |
| Phenolic compounds, mg/g in terms of gallic acid | 14.37±0.79 | 43.03±0.35                           | 31.09±0.31 |
| Flavonoids, mg/g in terms of epicatechin         | 14.12±0.93 | 30.15±0.25                           | 20.88±0.88 |
| (+)-Catechin                                     | 0.41*      | 0.58*                                | 0.04*      |
| (-)-Epicatechin                                  | 0.99*      | 3.44*                                | 0.67*      |
| Sum of monomers                                  | 1.40*      | 4.02*                                | 0.71*      |
| Dimeric proanthocyanidins                        | 1.49*      | 16.97*                               | 5.25*      |
| Trimeric proanthocyanidins 1                     | 0.48*      | 1.24*                                | 0.32*      |
| Trimeric proanthocyanidins 2                     | 1.73*      | 5.05*                                | 2.46*      |
| Tetrameric proanthocyanidins                     | 1.02*      | 1.16*                                | 0.32*      |
| Sum of flavan-3-oles                             | 6.12*      | 28.44*                               | 9.06*      |

\* – concentrations are given in mg/g in terms of epicatechin and dry weight

These data show that *Laurus nobilis* leaves are a valuable source of phenolic compounds, such as phenolic acids and flavonoids. Their total content in leaves can reach up to 99.7 g/kg (in terms of gallic acid).

Quantitative content of different groups of phenolic substances varies depending on the place of gathering, raw material source (cultivated or wild-growing plants), time (phase) of its gathering, drying and isolation methods etc.

Sesquiterpenic lactones, isolated from the *Laurus*

*nobilis* leaves are represented in the table 3. These compounds have different pharmacologic activities: antibacterial, antifungal[14], antidiabetic, anti-inflammatory (inhibits NO production), hepatoprotective [58], neuroprotective [44], inhibits alcohol adsorption, increase activity of liver glutathion-S-transferase, cytotoxic and induce apoptosis [59].

H.Hibasami with co-authors [60] have established, that sesquiterpenic lactones of *Laurus* – costunolide (4)

and zaluzanin D (26) exhibit a string growth-inhibiting influence in relation to cells of myeloid leucosis (HL-60) of human and provoke their apoptosis. Authors of this work as well as the majority of other researchers assume that  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactonic part of sesquiterpenic lactones – necessary condition for cytotoxic (antitumor) activity exhibition.

H.Matsuda and others have discovered that costunolide (4) also exhibits gastroprotective action [61].

M.Yoshikawa with co-authors have shown that  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactonic part conditions the ability of some sesquiterpenic lactones from *Laurus nobilis* leaves to inhibit an increased content of ethanol in blood [62]. N. Uchiyama colleagues have established that several sesquiterpenic lactones of this plant exhibit tripanocytic activity owing to the formation of covalent connection between their  $\alpha,\beta$ -non-saturated  $\gamma$ -lactonic part and nucleophiles [63].

During the experiment costunolide (4) and dehydrocostus lactone (24) showed inhibiting activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv with minimal inhibiting concentrations 6.25 mg/l and 12.5 mg/l, correspondingly. Activity of lactones mixture against medicine-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* was higher than for the individual compounds [64].

10 sesquiterpenic lactones: reynozin (21), magnolialide hydroperoxide (19), 1 $\beta$ ,2 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ H-eudesma-4(15),11(13)-dien-12,6-olid (14), santamarin (22), magnolealide (18), 3 $\alpha$ -peroxyarmefolin (20), 13-dehydrosantonin (13), tubiferin (23), anhydroperoxycostunolide (1), lucentolide (5) were isolated by E. Julianti from *Laurus nobilis* leaves. These compounds showed different levels of cytotoxicity towards the leucosis cells K562 [65].

Table 3 – Sesquiterpenic lactones found in *Laurus nobilis*

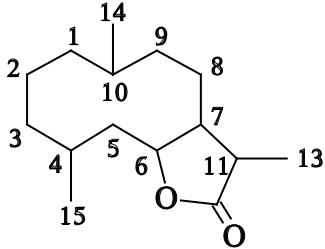
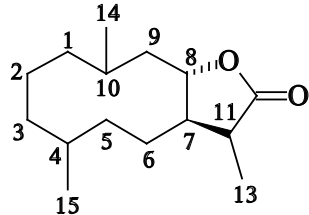
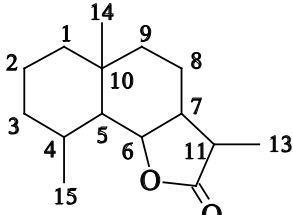
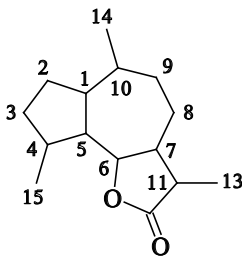
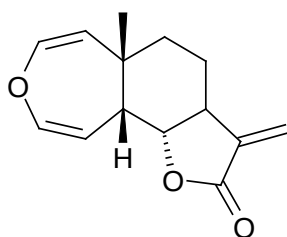
| No                                                                                                                                           | Trivial name              | Substituents position                                                | Source          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <p style="text-align: center;">Germacran-12,6-olides</p>   |                           |                                                                      |                 |
| 1.                                                                                                                                           | Anhydroperoxy-costunolide | 1-oxo; 4(5),11(13),10(14)-trien; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.          | [65]            |
| 2.                                                                                                                                           | Artemorin                 | 1(10),4(5),11(13)-trien; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.                  | [66, 67]        |
| 3.                                                                                                                                           | Verlotorin                | 1 $\beta$ -OOH; 4(5),11(13),10(14)-trien; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H. | [67]            |
| 4.                                                                                                                                           | Costunolide               | 1 $\beta$ -OH; 4(5),11(13),10(14)-trien; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.  | [59, 62, 66-69] |
| 5.                                                                                                                                           | Lucentolide               | 1 $\alpha$ -OH; 4(5),11(13),10(14)-trien; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H. | [65]            |
| <p style="text-align: center;">Germacran-12,8-olides</p>  |                           |                                                                      |                 |
| 6.                                                                                                                                           | Desacetillaure-nobiolide  | 6 $\alpha$ -H; 1(10),4(5),11(13)-trien; 7 $\alpha$ ,8 $\beta$ – H.   | [14, 67]        |
| <p style="text-align: center;">Eudesman-12,6-olides</p>   |                           |                                                                      |                 |

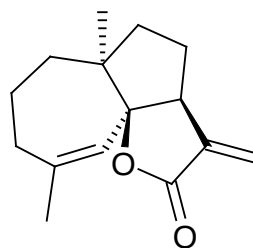
Table 3 continued

| No                                                                                                                                       | Trivial name                           | Substituents position                                                                                       | Source               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 7.                                                                                                                                       | No trivial name                        | 1,2 $\alpha$ /3,4 $\alpha$ -diepoxy; 11-en; 4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H. | [65]                 |
| 8.                                                                                                                                       | No trivial name                        | 1 $\alpha$ ,2 $\beta$ -diOH; 3,11-dien; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H.                 |                      |
| 9.                                                                                                                                       | No trivial name                        | 1 $\beta$ -OH; 4 $\alpha$ -OCH <sub>3</sub> ; 11-en; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H.    |                      |
| 10.                                                                                                                                      | No trivial name                        | 1 $\beta$ ,4 $\beta$ -diOH; 11-en; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H.                      |                      |
| 11.                                                                                                                                      | No trivial name                        | 1 $\beta$ -OH,2 $\beta$ -OAc; 4,11-dien; 5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ – H.                           |                      |
| 12.                                                                                                                                      | 10-epigazaniolid                       | 1,3,11(13)-trien; 5 $\alpha$ ,10 $\beta$ – H.                                                               | [59]                 |
| 13.                                                                                                                                      | 13-dehydrosantonin                     | 3-oxo; 1,4,11(13)-trien; 4 $\alpha$ -CH <sub>3</sub> ; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H.               | [65]                 |
| 14.                                                                                                                                      | No trivial name                        | 1 $\beta$ ,2 $\beta$ -diOH; 4(15),11(13)-dien; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -H.                        | [68]                 |
| 15.                                                                                                                                      | No trivial name                        | 1 $\beta$ ,15-diOH; 3,11(13)-dien; 5 $\alpha$ H,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H.                                 | [62]                 |
| 16.                                                                                                                                      | No trivial name                        | 3 $\alpha$ -AcO; 1,4(15),11(13)-trien; 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H.                   | [59]                 |
| 17.                                                                                                                                      | Gazaniolid                             | 1,3,11(13)-trien;10 $\alpha$ -H.                                                                            | [65]                 |
| 18.                                                                                                                                      | Magnolialid                            | 1 $\beta$ -OH; 4(5),11(13)-dien; 3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H.                         | [65]                 |
| 19.                                                                                                                                      | Magnolialide hydroperoxide             | 1 $\beta$ -OH; 4 $\alpha$ -OOH; 4(15),11(13)-dien; 7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H.                              | [65]                 |
| 20.                                                                                                                                      | 3 $\alpha$ -peroxyarmefolin            | 1 $\beta$ -OH; 3 $\alpha$ -OOH; 4(5),11(13)-dien; 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H.                    | [59, 62, 67-69]      |
| 21.                                                                                                                                      | Reynozin                               | 1 $\beta$ -OH; 4(15),11(13)-dien; 5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                                    | [59, 62, 65, 67, 68] |
| 22.                                                                                                                                      | Santamarin                             | 1 $\beta$ -OH; 3,11(13)-dien; 5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                                        | [65]                 |
| 23.                                                                                                                                      | Tubiferin                              | 3-oxo; 1,11(13)-dien; 4 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -H                          |                      |
| <p style="text-align: center;">Guaian-12,6-olides</p>  |                                        |                                                                                                             |                      |
| 24.                                                                                                                                      | Dehydrocostus lactone                  | 4(15),11(13),10(14)-trien; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.                               | [69]                 |
| 25.                                                                                                                                      | 3 $\beta$ –chlorodehydrocostus lactone | 3 $\beta$ -Cl; 4(15),11(13),10(14)-trien; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.                | [62, 66, 69]         |
| 26.                                                                                                                                      | Zaluzanin D                            | 3 $\beta$ -OAc; 4(15),11(13),10(14)-trien; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.               | [62, 69]             |
| 27.                                                                                                                                      | Zaluzanin C                            | 3 $\beta$ -OH; 4(15),11(13),10(14)-trien; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.                | [69]                 |
| 28.                                                                                                                                      | Eremantin                              | 4(15),11(13),9(10)-trien; 1 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ – H.                                | [69]                 |

## Other lactone types



Spirafolid [59]



No trivial name [66]

Thus, *Laurus nobilis* leaves contain a significant amount of essential oil, phenolic compounds and sesquiterpenic lactones different by their structure, as well as by the revealed types of pharmacological activity.

**Conclusion.** As the scientific literature data presented in the review showed, components of essential oil, phenolic compounds and sesquiterpenic lactones of *Laurus nobilis* are the leading groups of active substances. The studies of different researchers and research

groups have established differences in qualitative composition and quantitative content of these *Laurus* BAS. According to some researches, the variation pointed may be explained by different ecological, climatic, seasonal, genetic, and geographic factors [34], as well as difference of species and chemotypes of *Laurus* plants, condition of soil feeding, etc.

Pharmacological studies have established a varied activity spectrum of BAS from *Laurus nobilis* leaves.

Antibacterial (widely), anti-virus, anti-inflammatory, antidiabetic, and cytotoxic (anticancer) activities, discovered in extracts and individual compounds of *Laurus*

leaves, are perspective from the point of further researchers and working out of new treatment and preventive medicinal drugs.

#### Библиографический список

1. Ouchikh O., Chahed T., Ksouri R., Taarit M.B., Faleh H., Abdelly C., Kchouk M.E., Marzouk B. THE EFFECTS OF EXTRACTION METHOD ON THE MEASURED TOCOPHEROL LEVEL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *L. NOBILIS* VEGETATIVE ORGANS // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011. Vol. 24. P. 103–110. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.04.006
2. Ambrose D. C. P., Manickavasagan A., Naik R. *Leafy Medicinal Herbs: Botany, Chemistry, Postharvest Technology and Uses*. CABI, 2016. 296 p.
3. Speroni E., Cervellati R., Dall'Acqua S. Guerra M.C, Greco E., Govoni P., Innocenti G. GASTROPROTECTIVE EFFECT AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIFFERENT *LAURUS NOBILIS* L. LEAF EXTRACTS // *Journal of Medicinal Food*. 2011. Vol. 14. 499–504. DOI: 10.1089/jmf.2010.0084
4. Ramos C., Teixeira B., Batista I., Serrano M.C., Neng N.R., Nogueira J.M., Nunes M.L., Marques A. ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS OF BAY LAUREL *LAURUS NOBILIS* LINNAEUS (LAURACEAE) FROM PORTUGAL // *Natural Product Research*. 2012. Vol. 6. P. 518–529. DOI: 10.1080/14786419.2010.531478
5. Dall'Acqua S., Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M.C., Stella L., Greco E., Innocenti G. PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *LAURUS NOBILIS* L. LEAF INFUSION // *Journal of Medicinal Food*. 2009. Vol. 12. P. 869–876. DOI: 10.1089/jmf.2008.0119
6. Esra K., Ilkay O., Erdem Y. EVALUATION OF SOME PLANTS USED IN TURKISH FOLK MEDICINE FOR THEIR ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES // *Pharmac. Biol.* 2007. Vol. 45. Is. 7. P. 547–555.
7. Ramling P., Meera M., Priyanka P. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON *LAURUS NOBILIS* // *Int. J. of Pharm. and Chem. Sci.* 2012. Vol. 1. Is. 2. P. 595–602.
8. Bilen S., Bulut M. EFFECT OF LAUREL (*LAURUS NOBILIS*) ON THE NON-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM) // *J. of Animal and Veterinary Advances*. 2010. Vol. 9. Is. 8. P. 1275–1277. DOI: 10.3923/java.2010.1275.1279
9. Ham A., Shin J., Oh K., Lee S.-J., Nam K.-W., Koo U., Kim Kyeong, Mar W. NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THE N-HEXANE EXTRACTS OF *LAURUS NOBILIS* L. IN MODELS OF PARKINSON'S DISEASE // *Biomol. Ther.* 2011. Vol. 19. Is. 1. P. 118–125.
10. Rizi M.V. CHEMICAL COMPOSITION AND LARVICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *LAURUS NOBILIS* L. FROM IRAN. IRANIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES // *Iranian J. of Pharmac. Sci.* 2009. Vol. 5. Is. 1. P. 47–50.
11. Adwan G., Mhanna M. SYNERGISTIC EFFECTS OF PLANT EXTRACTS AND ANTIBIOTICS ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS // *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2008. Vol. 3. P. 134–139.
12. Al-Hussaini R., Mahasneh A.M. MICROBIAL GROWTH AND QUORUM SENSING ANTAGONIST ACTIVITIES OF HERBAL PLANTS EXTRACTS // *Molecules*. 2009. Vol. 14. Is. 9. P. 3425–3435.
13. El Malti, J., Amarouch H. ANTIBACTERIAL EFFECT, HISTOLOGICAL IMPACT AND OXIDATIVE STRESS STUDIES FROM *LAURUS NOBILIS* EXTRACT // *Journal of Food Quality*. 2009. Vol. 32. Is. 2. P. 190–208.
14. Fukuyama N., Ino Ch., Suzuki Y. Kobayashi N., Hamamoto H., Sekimizu K., Orihara Y. ANTIMICROBIAL SESQUITERPENOIDES FROM *LAURUS NOBILIS* L. // *Natural Product Research*. 2011. Vol. 25. Is. 14. P. 1295–1303. DOI: 10.1080/14786419.2010.502532
15. Огай М.А., Степанова Э.Ф. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ФИТОСБОРА // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2006. № 2. С. 332–333.
16. Огай М.А., Степанова Э.Ф., Ларионов Л.П., Петров А.Ю. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ФИТОГЕЛЕЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2009. № 2. С. 171–173.
17. Бабякин А.Ф., Найданова Л.Ф., Мазуров В.И., Руженков Д.В., Кириченко Н.Н. Способ получения средства для лечения сахарного диабета // Пат. 2071783. Россия, МКИ 6 А 61 К 35/78. / № 93044820/14; Заявл. 07.09.93; Оpubл. 20.01.97, Бюл. № 2.
18. Смирнов В.М. Биологически активная пищевая добавка и способ повышения умственной и физической работоспособности человека // Пат. 2176895. Россия. 7А 23Л 1/30 А, 7А 61К 35/78 В / № 99124708/13; Заявл. 22.11.1999; Оpubл. 2001.
19. Özcan M., Chalchat J.-C. EFFECT OF DIFFERENT LOCATIONS ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF LAUREL (*LAURUS NOBILIS* L.) LEAVES GROWING WILD IN TURKEY // *Journal of Medicinal food*. 2005. Vol. 8. Is. 3. P. 408–411. DOI: 10.1089/jmf.2005.8.408

20. Basak S. S., Candan F. EFFECT OF LAURUS NOBILIS L. ESSENTIAL OIL AND ITS MAIN COMPONENTS ON A-GLUCOSIDASE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES SCAVENGING ACTIVITY // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2013. Vol. 12. Is. 2. P. 367–379.
21. Moghtader M., Salari H. COMPARATIVE SURVEY ON THE ESSENTIAL OIL COMPOSITION FROM THE LEAVES AND FLOWERS OF LAURUS NOBILIS L. FROM KERMAN PROVINCE // *Journal of Ecology and the Natural Environment*. 2012. Vol. 4. Is. 6. P. 150–153.
22. Verdian-rizi M., Hadjiakhoondi A. ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF LAURUS NOBILIS L. OF DIFFERENT GROWTH STAGES GROWING IN IRAN // *Z. Naturforsch.* 2008. Vol. 63. P. 785–788.
23. Lin Z.K., Hua Y.F., Gong G.P., Gu Y.H. CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE ESSENTIAL OILS FROM THE LEAVES OF LAURUS NOBILIS AND TENDENCY IN CHANGES OF THE CONSTITUENTS MONTH BY MONTH // *Acta Bot. Sin.* 1990. Vol. 32. P. 878–882.
24. Marzouki H., Piras A., Salah K.B., Medini H., Pivetta T., Bouzid S., Marongiu B., Falconieri D. ESSENTIAL OIL COMPOSITION AND VARIABILITY OF LAURUS NOBILIS L. GROWING IN TUNISIA, COMPARISON AND CHEMOMETRIC INVESTIGATION OF DIFFERENT PLANT ORGANS // *Natural Product Research*. 2009. Vol. 23. No. 4. P. 343–354. DOI: 10.1080/14786410802076200
25. Derwich E., Benziane Z., Boukir A. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEAVES ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS FROM MOROCCO // *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009. Vol. 3. Is. 4. P. 3818–3824.
26. Politeo O., Jukic M., Milos M. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FREE VOLATILE AGLYCONES FROM BAY (LAURUS NOBILIS L.) COMPARED TO ITS ESSENTIAL OIL // *Croatia Chem. Acta*. 2007. Vol. 80. P. 121–126.
27. Flamini G., Tebano M., Cioni P.L., Ceccarini L., Ricci A.S., Longo I. COMPARISON BETWEEN THE CONVENTIONAL METHOD OF EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS L. AND A NOVEL METHOD WHICH USES MICROWAVES APPLIED IN SITU, WITHOUT RESORTING TO AN OVEN // *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1143. P. 36–40. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.031
28. Fiorini C., Fouraste I., David B., Bessiere J. M. COMPOSITION OF THE FLOWER, LEAF AND STEM ESSENTIAL OILS FROM LAURUS NOBILIS L. // *Flavour and fragrance journal*. 1997. Vol. 12. P. 91–93.
29. Ramos C., Teixeira B., Batista I., Matos O., Serrano C., Neng N.R., Nogueira J.M., Nunes M.L., Marques A. ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS OF BAY LAUREL LAURUS NOBILIS LINNAEUS (LAURACEAE) FROM PORTUGAL // *Natural Product Research*. 2012. Vol. 26. N. 6. P. 518–529. DOI: 10.1080/14786419.2010.531478
30. Di Leo Lira P., Retta D., Tkacik E., Ringuelet J., Coussio J. D., Baren C. M., Bandoni A. L. ESSENTIAL OIL AND BY-PRODUCTS OF DISTILLATION OF BAY LEAVES (LAURUS NOBILIS L.) FROM ARGENTINA // *Industrial Crops and Products*. 2009. Vol. 30. P. 259–264. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.04.005
31. Da Silveira Sh.M., Luciano F.B., Fronza N., Anildo Cunha Jr. Gerson Neudi Scheuermann, Cleide Rosana Werneck Vieira. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LAURUS NOBILIS ESSENTIAL OIL TOWARDS FOODBORNE PATHOGENS AND ITS APPLICATION IN FRESH TUSCAN SAUSAGE STORED AT 7°C // *Food Science and Technology*. 2014. P. 1–8. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.032
32. Riaz M., Ashraf C.M., Chaudhary F.M. STUDIES ON THE ESSENTIAL OIL OF THE PAKISTANI LAURUS NOBILIS LINN. IN DIFFERENT SEASONS // *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 1989. Vol. 32. P. 33–35.
33. Kevseroglu K., Crak C., Ozyaz G. A STUDY ON ONTOGENETIC AND DIURNAL VARIABILITY OF LAUREL (LAURUS NOBILIS L.) LEAVES // *Turkish Journal of Field Crops*. 2003. Vol. 8. Is.1. P. 29–32.
34. Papageorgiou V., Mallouchos A., Komaitis M. INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT BEHAVIOUR OF AIR – AND FREEZE-DRIED AROMATIC PLANT MATERIALS IN RELATION TO THEIR PHENOLIC CONTENT AND VEGETATIVE CYCLE // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56. P. 5743–5752. DOI: 10.1021/jf8009393
35. Mitic-Culafic D., Zegura B., Nikolic B., Vukovic-Gacic B., Knezevic-Vukcevic J., Filipic M. PROTECTIVE EFFECT OF LINALOOL, MYRCENE AND EUCALYPTOL AGAINST T-BUTYL HYDROPEROXIDE INDUCED GENOTOXICITY IN BACTERIA AND CULTURED HUMAN CELLS // *Food and Chemical Toxicology*. 2009. Vol. 47. P. 260–266. DOI: 10.1016/j.fct.2008.11.015
36. Bagamboula C.E., Uyttendaele M., Debevere J. INHIBITORY EFFECT OF THYME AND BASIL ESSENTIAL OILS, CARVACROL, THYMOL, ESTRAGOL, LINALOOL AND P-CYMENE TOWARDS SHIGELLA SONNEI AND S. FLEXNERI // *Food Microbiology*. 2004. Vol. 21. P. 33–42. DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00046-7
37. Koba K., Poutouli P.W., Raynaud C., Chaumont J.-P., Sanda K. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF DIFFERENT BASIL ESSENTIAL OILS CHEMOTYPES FROM TOGO // *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2009. Vol. 4. Is. 1. P. 1–8. DOI: 10.3329/bjp.v4i1.998
38. Burt S. ESSENTIAL OILS: THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES AND POTENTIAL APPLICATIONS IN FOODS – A REVIEW // *International Journal of Food Microbiology*. 2004. Vol. 94. P. 223–253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

39. De Corato U., Maccioni O., Trupo M., Di Sanzo G. USE OF ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS OBTAINED BY MEANS OF A SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE TECHNIQUE AGAINST POST HARVEST SPOILAGE FUNGI // *Crop Protection*. 2010. Vol. 29. Is. 2. P. 142–147. DOI: 10.1016/j.cropro.2009.10.012
40. Millezi A.F., Caixeta D.S., Rossoni D.F., Cardoso M.G., Piccoli R. IN VITRO ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF PLANT ESSENTIAL OILS THYMUS VULGARIS, CYMBOPOGON CITRATUS AND LAURUS NOBILIS AGAINST FIVE IMPORTANT FOODBORNE PATHOGENS // *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2012. Vol. 32. P. 167–172. DOI: 10.1590/S0101-20612012005000021
41. Chericoni S., Prieto J.M., Iacopini P., Morelli I. ESSENTIAL OILS OF COMMONLY USED PLANTS AS INHIBITORS OF PEROXYNITRITE-INDUCED TYROSINE NITRATION // *Fitoterapia*. 2005. Vol. 76. Is. 5. P. 481–483. DOI: 10.1016/j.fitote.2005.04.010
42. Guynot M.E., Ramos A.J., Seto L., Purroy P., Sanchis V., Marín S. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF VOLATILE COMPOUNDS GENERATED BY ESSENTIAL OILS AGAINST FUNGI COMMONLY CAUSING DETERIORATION OF BAKERY PRODUCTS // *Journal of Applied Microbiology*. 2003. Vol. 94. Is. 5. P. 893–899. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01927.x
43. Saab A. M., Tundis R., Loizzo M. R. Lampronti I., Borgatti M., Gambari R., Menichini F., Esseily F., Menichini F. ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF LAURUS NOBILIS L. (LAURACEAE) LEAVES AND SEEDS ESSENTIAL OILS AGAINST K562 HUMAN CHRONIC MYELOGENOUS LEUKAEMIA CELLS // *Natural product research*. 2012. Vol. 26. Is. 18. P. 1741–1745. DOI: 10.1080/14786419.2011.608674
44. Patrakar R., Mansuriya M., Patil P. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON LAURUS NOBILIS // *International journal of pharmaceutical and chemical sciences*. 2012. Vol. 1 (2). P. 595–602.
45. Sayyah M., Valizadeh J., Kamalinejad M. ANTICONVULSANT ACTIVITY OF THE LEAF ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS AGAINST PENTYLENETETRAZOLE- AND MAXIMAL ELECTROSHOCK-INDUCED SEIZURES // *Phytomedicine*. 2002. Vol. 9. P. 212–216. DOI: 10.1078/0944-7113-00113
46. Dias M. I., Barreira J., Calhelha R.C., Queiroz Maria-João R. P., Oliveira, Marina Soković M. Beatriz P. P., Ferreira Isabel C. F. R. TWO-DIMENSIONAL PCA HIGHLIGHTS THE DIFFERENTIATED ANTITUMOR AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF METHANOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS OF LAURUS NOBILIS L. FROM DIFFERENT ORIGINS // *BioMed research international*. 2014. Vol. 2014. 10 p. DOI: 10.1155/2014/520464
47. Kang Yu K.W., Jun W.J., Chang I.S., Han S.B., Kim H.Y., Cho H.Y. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ALKYL PEROXY RADICAL SCAVENGING COMPOUND FROM LEAVES OF LAURUS NOBILIS // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25. Is. 1. P. 102–108.
48. De Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. MEGASTIGMANE AND PHENOLIC COMPONENTS FROM LAURUS NOBILIS L. LEAVES AND THEIR INHIBITORY EFFECTS ON NITRIC OXIDE PRODUCTION // *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52. P. 7525–7531. DOI: 10.1021/jf048782t
49. Muchuweti M., Kativu E., Mupure C. H., Chidewe C., Ndhala A. R., Benhura M.A.N. PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SOME SPICES // *American Journal of Food Technology*. 2007. Vol. 2. Is. 5. P. 414–420. DOI: 10.3923/ajft.2007.414.420
50. Lee S., Chung S.-Ch., Lee S.-H., Park W., Oh I., Mar W., Shin J., Oh K.-B. ACYLATED KAEMPFEROL GLYCOSIDES FROM LAURUS NOBILIS LEAVES AND THEIR INHIBITORY EFFECTS ON NA<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ADENOSINE TRIPHOSPHATASE // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. Vol. 35. Is. 3. P. 428–432. DOI: 10.1248/bpb.35.428
51. Pacifico S., Gallicchio M., Lorenz P., Duckstein S.M., Potenza N., Galasso S., Marciano S., Fiorentino A., Stintzing F.C., Monaco P. NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF LAURUS NOBILIS ANTIOXIDANT POLYPHENOL-ENRICHED LEAF EXTRACTS // *Chemical research in toxicology*. 2014. Vol. 27. Is. 4. P. 611–626. DOI: 10.1021/tx5000415
52. Dias M.I., Barros L., Duenas M. Alves R.C., Oliveira M.B., Santos-Buelga C., Ferreira I.C. NUTRITIONAL AND ANTIOXIDANT CONTRIBUTIONS OF LAURUS NOBILIS L. LEAVES: WOULD BE MORE SUITABLE A WILD OR A CULTIVATED SAMPLE? // *Food chemistry*. 2014. Vol. 156. P. 339–346. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.122
53. Muñoz-Márquez D.B., Martínez-Ávila G.C., Wong-Paz J.E., Belmares-Cerda R., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C.N. ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM LAURUS NOBILIS L. AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY // *Ultrasonics sonochemistry*. 2013. Vol. 20. Is. 5. P. 1149–1154. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.02.008
54. Мусієнко С.Г., Кисличенко В.С. ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК СИРОВИНИ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО // *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика*. 2014. № 23. С. 341–344.
55. Lu M., Yuan B., Zeng M., Chen J. ANTIOXIDANT CAPACITY AND MAJOR PHENOLIC COMPOUNDS OF SPICES COMMONLY CONSUMED IN CHINA // *Food Research International*. 2011. Vol. 44. Is. 2. P. 530–536. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.055
56. Vinha A.F., Guido, L. F., Costa, A.S., Alves R.C., Oliveira M.B. MONOMERIC AND OLIGOMERIC FLAVAN-3-OLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEAVES FROM DIFFERENT LAURUS SP // *Food & function*. 2015. Vol. 6. Is. 6. P. 1944–1949. DOI: 10.1039/c5fo00229j

57. Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M., Knez Z. PHENOLS, PROANTHOCYANIDINS, FLAVONES AND FLAVONOLS IN SOME PLANT MATERIALS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITIES // *Food chemistry*. 2005. Vol. 89. Is. 2. P. 191–198. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.025
58. Lim S., Lee S.-J., Nam K.-W., Kim K.H., Mar W. HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF REYNOSIN AGAINST THIOACETAMIDE-INDUCED APOPTOSIS IN PRIMARY HEPATOCYTES AND MOUSE LIVER // *Arch. Pharm. Res.* 2013. Vol. 36. Is. 4. P. 485–494. DOI: 10.1007/s12272-013-0039-0
59. Fang F., Sang Sh., Chen K.Y., Gossiau A., Ho C.-T., Rosen R.T. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CYTOTOXIC COMPOUNDS FROM BAY LEAF (LAURUS NOBILIS) // *Food Chemistry*. 2005. Vol. 93. P. 497–501. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.029
60. Hibasami H., Yamada Y., Moteki H., Katsuzaki H., Imai K., Yoshioka K., Komiya T. SESQUITERPENES (COSTUNOLIDE AND ZALUZANIN D) ISOLATED FROM LAUREL (LAURUS NOBILIS L.) INDUCE CELL DEATH AND MORPHOLOGICAL CHANGE INDICATIVE OF APOPTOTIC CHROMATIN CONDENSATION IN LEUKEMIA HL-60 CELLS // *International Journal of Molecular Medicine*. 2003. Vol. 12. P. 147–151.
61. Matsuda H., Shimoda H., Ninomiya K., Yoshikawa M. INHIBITORY MECHANISM OF COSTUNOLIDE, A SESQUITERPENE LACTONE ISOLATED FROM LAURUS NOBILIS, ON BLOOD-ETHANOL ELEVATION IN RATS: INVOLVEMENT OF INHIBITION OF GASTRIC EMPTYING AND INCREASE IN GASTRIC JUICE SECRETION // *Alcohol and Alcoholism*. 2002. Vol. 37. P. 121–127. DOI: 10.1093/alcalc/37.2.121
62. Yoshikawa M., Shimoda H., Uemura T., Morikawa T., Kawahara Y., Matsuda H. ALCOHOL ABSORPTION INHIBITORS FROM BAY LEAF (LAURUS NOBILIS): STRUCTURE-REQUIREMENTS OF SESQUITERPENES FOR THE ACTIVITY // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2000. Vol. 8. P. 2071–2077. DOI: 10.1016/S0968-0896(00)00127-9
63. Uchiyama N., Matsunaga K., Kiuchi F., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J., Aoki T. TRYPANOCIDAL TERPENOID FROM LAURUS NOBILIS L. // *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 2002. Vol. 50. P. 1514–1516. DOI: 10.1248/cpb.50.1514
64. Luna-Herrera J., Costa M.C., Gonzalez H.G., Rodrigues A. I., Castilho P. C. SYNERGISTIC ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF SESQUITERPENE LACTONES FROM LAURUS SPP. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007. Vol. 59. Is. 3. P. 548–552. DOI: 10.1093/jac/dkl523
65. Julianti E., Jang K.H., Lee S., Lee D., Mar W., Oh K.B., Shin J. SESQUITERPENES FROM THE LEAVES OF LAURUS NOBILIS L. // *Phytochemistry*. 2012. Vol. 80. P. 70–76. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.05.013
66. Dall'Acqua St., Viola G., Giorgetti M., Loi M.C., Innocenti G. TWO NEW SESQUITERPENE LACTONES FROM THE LEAVES OF LAURUS NOBILIS // *Chem. Pharm. Bull.* 2006. Vol. 54. Is. 8. P. 1187–1189.
67. El-Ferally F.S., Benigni D.A. SESQUITERPENE LACTONES OF LAURUS NOBILIS LEAVES // *Journal of natural products*. 1980. Vol. 43. Is. 4. P. 527–531.
68. De Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. NEW SESQUITERPENE LACTONES FROM LAURUS NOBILIS LEAVES AS INHIBITORS OF NITRIC OXIDE PRODUCTION // *Planta med.* 2005. Vol. 71. P. 706–710. DOI: 10.1055/s-2005-864191
69. Tanaka R., Sakano Y., Shimizu K., Shibuya M., Ebizuka Y., Goda Y. CONSTITUENTS OF LAURUS NOBILIS L. INHIBIT RECOMBINANT HUMAN LANOSTEROL SYNTHASE // *J. Nat. Med.* 2006. Vol. 60. P. 78–81. DOI: 10.1007/s11418-005-0013-3

### References

1. Ouchikh O., Chahed T., Ksouri R., Taarit M.B., Faleh H., Abdelly C., Kchouk M.E., Marzouk B. THE EFFECTS OF EXTRACTION METHOD ON THE MEASURED TOCOPHEROL LEVEL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF L. NOBILIS VEGETATIVE ORGANS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011. Vol. 24. P. 103–110. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.04.006
2. Ambrose D. C. P., Manickavasagan A., Naik R. *Leafy Medicinal Herbs: Botany, Chemistry, Postharvest Technology and Uses*. CABI, 2016. 296 p.
3. Speroni E., Cervellati R., Dall'Acqua S., Guerra M.C., Greco E., Govoni P., Innocenti G. GASTROPROTECTIVE EFFECT AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIFFERENT LAURUS NOBILIS L. LEAF EXTRACTS. *Journal of Medicinal Food*. 2011. Vol. 14. P. 499–504. DOI: 10.1089/jmf.2010.0084
4. Ramos C., Teixeira B., Batista I., Serrano M.C., Neng N.R., Nogueira J.M., Nunes M.L., Marques A. ANTI-OXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS OF BAY LAUREL LAURUS NOBILIS LINNAEUS (LAURACEAE) FROM PORTUGAL. *Natural Product Research*. 2012. Vol. 6. P. 518–529. DOI: 10.1080/14786419.2010.531478
5. Dall'Acqua S., Cervellati R., Speroni E., Costa S., Guerra M.C., Stella L., Greco E., Innocenti G. PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LAURUS NOBILIS L. LEAF INFUSION. *Journal of Medicinal Food*. 2009. Vol. 12. P. 869–876. DOI: 10.1089/jmf.2008.0119
6. Esra K., Ilkay O., Erdem Y. EVALUATION OF SOME PLANTS USED IN TURKISH FOLK MEDICINE FOR THEIR ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES. *Pharmac. Biol.* 2007. Vol. 45. Is. 7. P. 547–555.

7. Ramling P., Meera M., Priyanka P. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON LAURUS NOBILIS. *Int. J. of Pharm. and Chem. Sci.* 2012. Vol. 1. Is. 2. P. 595–602.
8. Bilen S., Bulut M. EFFECT OF LAUREL (LAURUS NOBILIS) ON THE NON-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES OF RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS, WALBAUM). *J. of Animal and Veterinary Advances*. 2010. Vol. 9. Is. 8. P. 1275–1277. DOI: 10.3923/java.2010.1275.1279
9. Ham A., Shin J., Oh K., Lee S.-J., Nam K.-W., Koo U., Kim Kyeong, Mar W. NEUROPROTECTIVE EFFECT OF THE N-HEXANE EXTRACTS OF LAURUS NOBILIS L. IN MODELS OF PARKINSON'S DISEASE. *Biomol. Ther.* 2011. Vol. 19. Is. 1. P. 118–125.
10. Rizi M.V. CHEMICAL COMPOSITION AND LARVICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS L. FROM IRAN. *IRANIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. Iranian J. of Pharmac. Sci.* 2009. Vol. 5. Is. 1. P. 47–50.
11. Adwan G., Mhanna M. SYNERGISTIC EFFECTS OF PLANT EXTRACTS AND ANTIBIOTICS ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2008. Vol. 3. P. 134–139.
12. Al-Hussaini R., Mahasneh A.M. MICROBIAL GROWTH AND QUORUM SENSING ANTAGONIST ACTIVITIES OF HERBAL PLANTS EXTRACTS. *Molecules*. 2009. Vol. 14. Is. 9. P. 3425–3435.
13. El Malti, J., Amarouch H. ANTIBACTERIAL EFFECT, HISTOLOGICAL IMPACT AND OXIDATIVE STRESS STUDIES FROM LAURUS NOBILIS EXTRACT. *Journal of Food Quality*. 2009. Vol. 3. Is. 2. P. 190–208.
14. Fukuyama N., Ino Ch., Suzuki Y. Kobayashi N., Hamamoto H., Sekimizu K., Orihara Y. ANTIMICROBIAL SESQUITERPENOIDS FROM LAURUS NOBILIS L. *Natural Product Research*. 2011. Vol. 25. Is. 14. P. 1295–1303. DOI: 10.1080/14786419.2010.502532
15. Ogay M.A., Stepanova E.F. RAZRABOTKA I ISSLEDOVANIIE GIPOGLIKEMICHESKOGO FITOSBORA [DEVELOPMENT AND STUDY FOR HYPOGLYCEMIC PHYTOTEA]. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiia. Biologiia. Farmatsiia [Herald of Voronezh State University. Series: Chemistry, Biology, Pharmacy]*. 2006. No. 2. P. 332–333. (In Russ.)
16. Ogay M.A., Stepanova E.F., Larionov L.P., Petrov A.Y. FARMAKOLOGICHESKIE ISSLEDOVANIIA I TEKHNologiiA FITOGELEI DLIA KORREKTSII POSLEDSTVII SAKHARNOGO DIABETA [PHARMACOLOGIC STUDIES AND TECHNOLOGIES OF PHYTOGELS FOR CORRECTION OF DIABETES CONSEQUENCES]. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiia. Biologiia. Farmatsiia [Herald of Voronezh State University. Series: Chemistry, Biology, Pharmacy]*. 2009. No. 2. P. 171–173. (In Russ.)
17. Bebyakin A.F., Naydanova L.F., Mazurov V.I., Ruzhenkov D.V., Kirichenko N.N. Sposob polucheniya sredstva dlya lecheniya saharnogo diabeta [Method of obtainment of anti-diabetes drug]. Pat. 2071783. Russia, MKI 6 A 61 K 35/78. No. 93044820/14; 07.09.93; Published 20.01.97, Bul. no. 2. (In Russ.)
18. Smirnov V.M. Biologicheski aktivnaia pishchevaia dobavka i sposob povysheniia umstvennoi i fizicheskoi rabotosposobnosti cheloveka [Biologically active dietary supplement and methods to increase mental and physical activity]. Pat. 2176895. Russia, MPK: 7A 23L 1/30 A, 7A 61K 35/78 B. No. 99124708/13, 2001. Registration date: 22.11.1999. (In Russ.)
19. Özcan M., Chalchat J.-C. EFFECT OF DIFFERENT LOCATIONS ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF LAUREL (LAURUS NOBILIS L.) LEAVES GROWING WILD IN TURKEY. *Journal of Medicinal food*. 2005. Vol. 8. Is. 3. P. 408–411. DOI: 10.1089/jmf.2005.8.408
20. Basak S. S., Candan F. EFFECT OF LAURUS NOBILIS L. ESSENTIAL OIL AND ITS MAIN COMPONENTS ON  $\alpha$ -GLUCOSIDASE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES SCAVENGING ACTIVITY. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2013. Vol. 12. Is. 2. P. 367–379.
21. Moghtader M., Salari H. COMPARATIVE SURVEY ON THE ESSENTIAL OIL COMPOSITION FROM THE LEAVES AND FLOWERS OF LAURUS NOBILIS L. FROM KERMAN PROVINCE. *Journal of Ecology and the Natural Environment*. 2012. Vol. 4. Is. 6. P. 150–153.
22. Verdian-rizi M., Hadjiakhoondi A. ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF LAURUS NOBILIS L. OF DIFFERENT GROWTH STAGES GROWING IN IRAN. *Z. Naturforsch.* 2008. Vol. 63. P. 785–788.
23. Lin Z.K., Hua Y.F., Gong G.P., Gu Y.H. CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE ESSENTIAL OILS FROM THE LEAVES OF LAURUS NOBILIS AND TENDENCY IN CHANGES OF THE CONSTITUENTS MONTH BY MONTH. *Acta Bot. Sin.* 1990. Vol. 32. P. 878–882.
24. Marzouki H., Piras A., Salah K.B., Medini H., Pivetta T., Bouzid S., Marongiu B., Falconieri D. ESSENTIAL OIL COMPOSITION AND VARIABILITY OF LAURUS NOBILIS L. GROWING IN TUNISIA, COMPARISON AND CHEMOMETRIC INVESTIGATION OF DIFFERENT PLANT ORGANS. *Natural Product Research*. 2009. Vol. 23. No. 4. P. 343–354. DOI: 10.1080/14786410802076200
25. Derwich E., Benziane Z., Boukir A. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEAVES ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS FROM MOROCCO. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009. Vol. 3. Is. 4. P. 3818–3824.

26. Politeo O., Jukic M., Milos M. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FREE VOLATILE AGLYCONES FROM BAY (LAURUS NOBILIS L.) COMPARED TO ITS ESSENTIAL OIL. *Croatia Chem. Acta*. 2007. Vol. 80. P. 121–126.
27. Flamini G., Tebano M., Cioni P.L., Ceccarini L., Ricci A.S., Longo I. COMPARISON BETWEEN THE CONVENTIONAL METHOD OF EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS L. AND A NOVEL METHOD WHICH USES MICROWAVES APPLIED IN SITU, WITHOUT RESORTING TO AN OVEN. *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1143. P. 36–40. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.031
28. Fiorini C., Fouraste I., David B., Bessiere J. M. COMPOSITION OF THE FLOWER, LEAF AND STEM ESSENTIAL OILS FROM LAURUS NOBILIS L. *Flavour and fragrance journal*. 1997. Vol. 12. P. 91–93.
29. Ramos C., Teixeira B., Batista I., Matos O., Serrano C., Neng N.R., Nogueira J.M., Nunes M.L., Marques A. AN-TIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS OF BAY LAUREL LAURUS NOBILIS LIN-NAEUS (LAURACEAE) FROM PORTUGAL. *Natural Product Research*. 2012. Vol. 26. N. 6. P. 518–529. DOI: 10.1080/14786419.2010.531478
30. Di Leo Lira P., Retta D., Tkacik E., Ringuelet J., Coussio J. D., Baren C. M., Bandoni A. L. ESSENTIAL OIL AND BY-PRODUCTS OF DISTILLATION OF BAY LEAVES (LAURUS NOBILIS L.) FROM ARGENTINA. *Industrial Crops and Prod-ucts*. 2009. Vol. 30. P. 259–264. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.04.005
31. Da Silveira Sh.M., Luciano F.B., Fronza N., Anildo Cunha Jr. Gerson Neudí Scheuer-mann, Cleide Rosana Werneck Vieira. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF LAURUS NOBILIS ESSENTIAL OIL TOWARDS FOODBORNE PATHOGENS AND ITS APPLICATION IN FRESH TUSCAN SAUSAGE STORED AT 7 °C. *Food Science and Technology*. 2014. P. 1–8. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.032
32. Riaz M., Ashraf C.M., Chaudhary F.M. STUDIES ON THE ESSENTIAL OIL OF THE PAKISTANI LAURUS NOBILIS LINN. IN DIFFERENT SEASONS. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 1989. Vol. 32. P. 33–35.
33. Kevseroglu K., Crak C., Ozyazc G. A STUDY ON ONTOGENETIC AND DIURNAL VARIABILITY OF LAUREL (LAURUS NOBILIS L.) LEAVES. *Turkish Journal of Field Crops*. 2003. Vol. 8. Is.1. P. 29–32.
34. Papageorgiou V., Mallouchos A., Komaitis M. INVESTIGATION OF THE ANTIOX-IDANT BEHAVIOUR OF AIR- AND FREEZE-DRIED AROMATIC PLANT MA-TERIALS IN RELATION TO THEIR PHENOLIC CONTENT AND VEGETATIVE CYCLE. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56. P. 5743–5752. DOI: 10.1021/jf8009393
35. Mitic-Culafic D., Zegura B., Nikolic B., Vukovic-Gacic B., Knezevic-Vukcevic J., Filipic M. PROTECTIVE EFFECT OF LINALOOL, MYRCENE AND EUCALYP-TOL AGAINST T-BUTYL HYDROPEROXIDE IN-DUCED GENOTOXICITY IN BACTERIA AND CULTURED HUMAN CELLS. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. Vol. 47. P. 260–266. DOI: 10.1016/j.fct.2008.11.015
36. Bagamboula C.E., Uyttendaele M., Debevere J. INHIBITORY EFFECT OF THYME AND BASIL ESSENTIAL OILS, CARVACROL, THYMOL, ESTRAGOL, LINAL-OOL AND P-CYMENE TOWARDS SHIGELLA SON-NEI AND S. FLEXNERI. *Food Microbiology*. 2004. Vol. 21. P. 33–42. DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00046-7
37. Koba K., Poutouli P.W., Raynaud C., Chaumont J.-P., Sanda K. CHEMICAL COM-POSITION AND ANTIMI-CROBIAL PROPERTIES OF DIFFERENT BASIL ES-SENTIAL OILS CHEMOTYPES FROM TOGO. *Ban-gladesh Journal of Pharmacology*. 2009. Vol. 4. Is. 1. P. 1–8. DOI: 10.3329/bjp.v4i1.998
38. Burt S. ESSENTIAL OILS: THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES AND POTENTIAL APPLICATIONS IN FOODS – A REVIEW. *International Journal of Food Microbiology*. 2004. Vol. 94. P. 223–253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
39. De Corato U., Maccioni O., Trupo M., Di Sanzo G. USE OF ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS OB-TAINED BY MEANS OF A SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE TECHNIQUE AGAINST POST HAR-VEST SPOILAGE FUNGI. *Crop Protection*. 2010. Vol. 29. Is. 2. P. 142–147. DOI: 10.1016/j.cropro.2009.10.012
40. Millezi A.F., Caixeta D.S., Rossoni D.F., Cardoso M.G., Piccoli R. IN VITRO ANTI-MICROBIAL PROPER-TIES OF PLANT ESSENTIAL OILS THYMUS VULGARIS, CYMBOPOGON CITRATUS AND LAURUS NOBILIS AGAINST FIVE IMPORTANT FOODBORNE PATHOGENS. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2012. Vol. 32. P. 167–172. DOI: 10.1590/S0101-20612012005000021
41. Chericoni S., Prieto J.M., Iacopini P., Morelli I. ESSENTIAL OILS OF COMMONLY USED PLANTS AS IN-HIBITORS OF PEROXYNITRITE-INDUCED TYROSINE NITRATION. *Fitoterapia*. 2005. Vol. 76. Is. 5. P. 481–483. DOI: 10.1016/j.fitote.2005.04.010
42. Guynot M.E., Ramos A.J., Seto L., Purroy P., Sanchis V., Marín S. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF VOLATILE COMPOUNDS GENERATED BY ESSENTIAL OILS AGAINST FUNGI COMMONLY CAUSING DETERI-ORATION OF BAKERY PRODUCTS. *Journal of Applied Microbiology*. 2003. Vol. 94. Is. 5. P. 893–899. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01927.x
43. Saab A. M., Tundis R., Loizzo M. R. Lampronti I., Borgatti M., Gambari R., Menichini F., Esseily F., Men-ichini F. ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVI-TY OF LAURUS NOBILIS L. (LAU-RACEAE) LEAVES AND SEEDS ESSENTIAL OILS AGAINST K562 HUMAN CHRONIC MYELOG-

- ENOUS LEUKAEMIA CELLS. *Natural product research*. 2012. Vol. 26. Is. 18. P. 1741–1745. DOI: 10.1080/14786419.2011.608674
44. Patrakar R., Mansuriya M., Patil P. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON LAURUS NOBILIS. *International journal of pharmaceutical and chemical sciences*. 2012. Vol. 1 (2). P. 595–602.
45. Sayyah M., Valizadeh J., Kamalinejad M. ANTICONVULSANT ACTIVITY OF THE LEAF ESSENTIAL OIL OF LAURUS NOBILIS AGAINST PENTYLENE-TETRAZOLE- AND MAXIMAL ELECTROSHOCK-INDUCED SEIZURES. *Phyto-medicine*. 2002. Vol. 9. P. 212–216. DOI: 10.1078/0944-7113-00113
46. Dias M. I., Barreira J., Calhelha R.C., Queiroz Maria-João R. P., Oliveira, Marina Soković M. Beatriz P. P., Ferreira Isabel C. F. R. TWO-DIMENSIONAL PCA HIGH-LIGHTS THE DIFFERENTIATED ANTITUMOR AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF METHANOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS OF LAURUS NOBILIS L. FROM DIFFERENT ORIGINS. *BioMed research international*. 2014. Vol. 2014. 10p. DOI: 10.1155/2014/520464
47. Kang Yu K.W., Jun W.J., Chang I.S., Han S.B., Kim H.Y., Cho H.Y. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ALKYL PEROXY RADICAL SCAVENGING COMPOUND FROM LEAVES OF LAURUS NOBILIS. *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25. Is.1. P. 102-108.
48. De Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. MEGASTIGMANE AND PHENOLIC COMPONENTS FROM LAURUS NOBILIS L. LEAVES AND THEIR INHIBITORY EFFECTS ON NITRIC OXIDE PRODUCTION. *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52. P. 7525–7531. DOI: 10.1021/jf048782t
49. Muchuweti M., Kativu E., Mupure C. H., Chidewe C., Ndhala A. R., Benhura M.A.N. PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SOME SPICES. *American Journal of Food Technology*. 2007. Vol. 2. Is. 5. P. 414–420. DOI: 10.3923/ajft.2007.414.420
50. Lee S., Chung S.-Ch., Lee S.-H., Park W., Oh I., Mar W., Shin J., Oh K.-B. ACYLATED KAEMPFEROL GLYCOSIDES FROM LAURUS NOBILIS LEAVES AND THEIR INHIBITORY EFFECTS ON NA<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. *Biol. Pharm. Bull.* 2012. Vol. 35. Is. 3. P. 428–432. DOI: 10.1248/bpb.35.428
51. Pacifico S., Gallicchio M., Lorenz P., Duckstein S.M., Potenza N., Galasso S., Marciano S., Fiorentino A., Stintzing F.C., Monaco P. NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF LAURUS NOBILIS ANTIOXIDANT POLYPHENOL-ENRICHED LEAF EXTRACTS. *Chemical research in toxicology*. 2014. Vol. 27. Is. 4. P. 611-626. DOI: 10.1021/tx5000415
52. Dias M.I., Barros L., Duenas M. Alves R.C., Oliveira M.B., Santos-Buelga C., Ferreira I.C. NUTRITIONAL AND ANTIOXIDANT CONTRIBUTIONS OF LAURUS NOBILIS L. LEAVES: WOULD BE MORE SUITABLE A WILD OR A CULTIVATED SAMPLE? *Food chemistry*. 2014. Vol. 156. P. 339-346. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.122
53. Muñoz-Márquez D.B., Martínez-Ávila G.C., Wong-Paz J.E., Belmares-Cerda R., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C.N. ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM LAURUS NOBILIS L. AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY. *Ultrasonics sonochemistry*. 2013. Vol. 20. Is. 5. P. 1149–1154. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.02.008
54. Musienko S.G., Kislichenko V.S. DOSLIDZHENNYA FENOLNIH SPOLUK SIRO-VINI LAVRA BLAGORODNOGO [RESEARCH OF PHENOL COMPONENTS OF RAW MATERIAL OF LAVRA NOBILIS]. *Zbornik naukovih prac spivrobotnikov NMAPO im. P.L. Shupika [Collection of scientific works of employees of NMAPE named P.L. Shupik]*. 2014. No. 23 (4). P. 341–344. (In Ukr.)
55. Lu M., Yuan B., Zeng M., Chen J. ANTIOXIDANT CAPACITY AND MAJOR PHENOLIC COMPOUNDS OF SPICES COMMONLY CONSUMED IN CHINA. *Food Research International*. 2011. Vol. 44. Is. 2. P. 530-536. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.055
56. Vinha A.F., Guido, L. F., Costa, A.S., Alves R.C., Oliveira M.B. MONOMERIC AND OLIGOMERIC FLAVAN-3-OLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEAVES FROM DIFFERENT LAURUS SP. *Food & function*. 2015. Vol. 6. Is. 6. P.1944-1949. DOI: 10.1039/c5fo00229j
57. Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M., Knez Z. PHENOLS, PRO-ANTHOCYANIDINS, FLAVONES AND FLAVONOLS IN SOME PLANT MATERIALS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITIES. *Food chemistry*. 2005. Vol. 89. Is. 2. P. 191-198. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.025
58. Lim S., Lee S.-J., Nam K.-W., Kim K.H., Mar W. HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF REYNOSIN AGAINST THIOACETAMIDE-INDUCED APOPTOSIS IN PRIMARY HEPATOCYTES AND MOUSE LIVER. *Arch. Pharm. Res.* 2013. Vol. 36. Is. 4. P. 485-494. DOI: 10.1007/s12272-013-0039-0
59. Fang F., Sang Sh., Chen K.Y. Gossau A., Ho C.-T., Rosen R.T. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CYTOTOXIC COMPOUNDS FROM BAY LEAF (LAURUS NOBILIS). *Food Chemistry*. 2005. Vol. 93. P. 497-501. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.029
60. Hibasami H., Yamada Y., Moteki H., Katsuzaki H., Imai K., Yoshioka K., Komiya T. SESQUITERPENES (COSTUNOLIDE AND ZALUZANIN D) ISOLATED FROM LAUREL (LAURUS NOBILIS L.) INDUCE CELL DEATH AND MORPHOLOGICAL CHANGE INDICATIVE OF APOPTOTIC CHROMATIN CONDENSATION IN LEUKEMIA HL-60 CELLS. *International Journal of Molecular Medicine*. 2003. Vol. 12. P. 147–151.
61. Matsuda H., Shimoda H., Ninomiya K., Yoshikawa M. INHIBITORY MECHANISM OF COSTUNOLIDE, A

- SESQUITERPENE LACTONE ISOLATED FROM LAURUS NOBILIS, ON BLOOD-ETHANOL ELEVATION IN RATS: INVOLVEMENT OF INHIBITION OF GASTRIC EMPTYING AND INCREASE IN GASTRIC JUICE SECRETION. *Alcohol and Alcoholism*. 2002. Vol. 37. P. 121–127. DOI: 10.1093/alcalc/37.2.121
62. Yoshikawa M., Shimoda H., Uemura T., Morikawa T., Kawahara Y., Matsuda H. AL-COHOL ABSORPTION INHIBITORS FROM BAY LEAF (LAURUS NOBILIS): STRUCTURE-REQUIREMENTS OF SESQUITERPENES FOR THE ACTIVITY. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2000. Vol. 8. P. 2071–2077. DOI: 10.1016/S0968-0896(00)00127-9
63. Uchiyama N., Matsunaga K., Kiuchi F., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J., Aoki T. TRYPTANOCIDAL TERPENOIDS FROM LAURUS NOBILIS L. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 2002. Vol. 50. P. 1514–1516. DOI: 10.1248/cpb.50.1514
64. Luna-Herrera J., Costa M.C., Gonzalez H.G., Rodrigues A. I., Castilho P. C. SYNERGISTIC ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITIES OF SESQUITERPENE LACTONES FROM LAURUS SPP. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007. Vol. 59. Is. 3. P. 548–552. DOI: 10.1093/jac/dkl523
65. Julianti E., Jang K.H., Lee S., Lee D., Mar W., Oh K.B., Shin J. SESQUITERPENES FROM THE LEAVES OF LAURUS NOBILIS L. *Phytochemistry*. 2012. Vol. 80. P. 70–76. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.05.013
66. Dall'Acqua St., Viola G., Giorgetti M., Loi M.C., Innocenti G. TWO NEW SESQUITERPENE LACTONES FROM THE LEAVES OF LAURUS NOBILIS. *Chem. Pharm. Bull.* 2006. Vol. 54. Is.8. P. 1187–1189.
67. El-Ferally F.S., Benigni D.A. SESQUITERPENE LACTONES OF LAURUS NOBILIS LEAVES. *Journal of natural products*. 1980. Vol. 43. Is. 4. P. 527–531.
68. De Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. NEW SESQUITERPENE LACTONES FROM LAURUS NOBILIS LEAVES AS INHIBITORS OF NITRIC OXIDE PRODUCTION. *Planta med.* 2005. Vol. 71. P. 706–710. DOI: 10.1055/s-2005-864191
69. Tanaka R., Sakano Y., Shimizu K., Shibuya M., Ebizuka Y., Goda Y. CONSTITUENTS OF LAURUS NOBILIS L. INHIBIT RECOMBINANT HUMAN LANTANOL SYNTHASE. *J. Nat. Med.* 2006. Vol. 60. P. 78–81. DOI: 10.1007/s11418-005-0013-3

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Авторы:**

**Насухова Наида Махмудовна** – аспирант кафедры фармакогнозии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фитохимия, фармакогнозия.

**Логвиненко Лидия Алексеевна** – научный сотрудник лаборатории ароматических и лекарственных растений ФГБУН «НБС-ННЦ», пгт. Никита, Республика Крым. Область научных интересов: интродукция и селекция лекарственных растений, куратор коллекции лекарственных растений.

**Харченко Алла Леонидовна** – младший научный сотрудник лаборатории парковедения ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН». Область научных интересов: интродукция и биология развития древесных растений. E-mail: alla09@nxt.ru

**Коновалов Дмитрий Алексеевич** – доктор фармацевтических наук, профессор, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фитохимия, фармакогнозия, сесквитерпеновые лактоны, полиацетиленовые соединения. E-mail: d.a.konovarov@pmedpharm.ru. ORCID: orcid.org/0000-0002-0960-6127

**Authors:**

**Nasukhova Naida Mahmudovna** – postgraduate student of the Chair of Pharmacognosy, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: phytochemistry, pharmacognosy. E-mail: konovalov\_da@pochta.ru

**Logvinenko Lidiya Alekseevna** – scientific worker of the laboratory of aromatic medicinal plants in Nikitsky Botanic Garden, Nikita, Republic of Crimea. Research interests: introduction and selection of medicinal plants, supervisor of the medicinal plants collection.

**Kharchenko Alla Leonidovna** – junior researcher of the park studies laboratory of the Federal State Funded Institution of Sciences “The Labour Red Order Banner Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre of RAS”. Research interests: introduction and development biology of woody plants. E-mail: alla09@nxt.ru

**Konovarov Dmitriy Alekseevich** – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: phytochemistry, pharmacognosy, sesquiterpenic lactones, polyacetylene compounds. E-mail: d.a.konovarov@pmedpharm.ru. ORCID: orcid.org/0000-0002-0960-6127

Поступила в редакцию: 18.04.2017

Принята к печати: 20.05.2017

Received: 18.04.2017

Accepted for publication: 20.05.2017

УДК 543.42.062:543.544.5:615.073:615.322

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО

М.А. Марченко<sup>1</sup>, И.Н. Зилфикаров<sup>1,2</sup>, Т.А. Ибрагимов<sup>3,4</sup>, А.Г. Малеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЗАО «ВИФИТЕХ», 142279, Россия, Московская обл., п. Оболенск, ГНЦ ПМБ, к. 84

<sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных  
и ароматических растений», 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет»,  
367000, Россия, Республика Дагестан, Махачкала, ул. Батырая, 4

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет»,  
367012, Россия, Республика Дагестан, Махачкала, ул. Ленина, 1

E-mail: marchenko.mariya2018@yandex.ru ; dagfarm@mail.ru

В статье представлены новые подходы к стандартизации сухого экстракта и лекарственных препаратов (ЛП) гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.). Предложены методики спектрофотометрического определения флавоноидов, терпенолактонов и гинкголевых кислот в активной фармацевтической субстанции (АФС) «Гинкго двулопастного экстракт сухой» (далее «экстракт гинкго»), а также методики анализа ЛП «ГИНКГО, таблетки, покрытые оболочкой, 40 мг» (далее «ГИНКГО, таблетки») и «ГИНКГО, раствор для приема внутрь, 40 мг/мл» (далее «ГИНКГО, раствор»). **Цель работы** – разработка и валидационная оценка методик стандартизации АФС растительного происхождения – экстракта гинкго, а также ЛП на его основе. **Материалы и методы.** Объектами исследования послужили образцы АФС «Гинкго двулопастного экстракт сухой», ЛП «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор», произведенные компанией ЗАО «ВИФИТЕХ» (Россия). Методы исследования: спектрофотометрия (далее «СФ-метрия») и высокоскоростная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Используемое оборудование: спектрофотометр СФ-56, производство ООО «ЛОМО-СПЕКТР» (Россия) и хроматограф жидкостный марки Shimadzu Prominence LC-20AD (Япония) с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа. **Результаты и обсуждение.** Использование метода СФ-метрии оптимизирует процесс анализа не только в ходе стандартизации готового продукта, но и на всех стадиях промышленного производства ЛП в рамках межоперационного контроля. Содержание суммы флавоноидов в образцах двух серий экстракта гинкго в пересчете на рутин составило методом прямой СФ-метрии –  $(29,64 \pm 0,36)\%$  и  $(28,88 \pm 0,54)\%$ ; методом дифференциальной СФ-метрии –  $(21,78 \pm 0,41)\%$  и  $(20,98 \pm 0,24)\%$ . Содержание суммы флавоноидов в препаратах «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор» составило: методом прямой СФ-метрии –  $(9,84 \pm 0,15)$  мг/таб. и  $(10,07 \pm 0,10)$  мг/мл; методом дифференциальной СФ-метрии –  $(7,33 \pm 1,13)$  мг/таб. и  $(8,30 \pm 0,13)$  мг/мл, соответственно. Проанализированы препараты-аналоги «МЕМОПЛАНТ» («Dr. Willimar Schwabe GmbH & Co. KG») и «ТАНАКАН®» («Beaufour Ipsen Industrie») – полученные результаты сопоставимы. Разработаны методики количественного определения в АФС суммы терпенолактонов методом дифференциальной СФ-метрии и остаточного содержания суммы гинкголевых кислот методом прямой СФ-метрии. В ходе их апробации было установлено, что количество гинкголактонов в исследованных образцах составляет  $(7,87 \pm 0,17)\%$  и  $(8,03 \pm 0,22)\%$  в пересчете на билобалид, а остаточное содержание суммы гинкголевых кислот не превышает 10 ppm. Подтверждена целесообразность и эффективность применения метода ВЭЖХ для одновременного определения подлинности и оценки доброкачественности субстанции и ЛП гинкго. **Заключение.** Разработаны методики СФ-метрического количественного определения суммы флавоноидов в АФС и ЛП, полученных из листьев гинкго двулопастного. Применительно к АФС предложены методики СФ-метрического определения суммы терпенолактонов и остаточного содержания суммы гинкголевых кислот. Разработанные методики отвечают валидационным критериям, характеризуются точностью и воспроизводимостью в сочетании с простотой исполнения и апробированы в условиях фармацевтического производства.

**Ключевые слова:** гинкго экстракт, гинкгофлавоногликозиды, терпенолактоны, гинкголевые кислоты, спектрофотометрия

### Для цитирования:

Марченко М.А., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А., Малеев А.Г. «РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО».

Фармация и фармакология. 2017;5(3):222-241.

DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-222-241

© Марченко М.А., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А., Малеев А.Г., 2017

### For citation:

Marchenko M.A., Zilfikarov I.N., Ibragimov T.A., Maleev A.G. "DEVELOPMENT OF THE METHODS OF STANDARTIZATION DRY EXTRACT AND MEDICAL DRUGS GINKGO BILOBA".

Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):222-241. (In Russ.)

DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-222-241

## DEVELOPMENT OF THE METHODS OF STANDARDIZATION DRY EXTRACT AND MEDICAL DRUGS GINKGO BILOBA

M.A. Marchenko<sup>1</sup>, I.N. Zilfikarov<sup>1,2</sup>, T.A. Ibragimov<sup>3,4</sup>, A.G. Maleev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CJSC «VIFITEH», 84, SSC PMB, Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia

<sup>2</sup> All-Russian Science Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 1, building, 7, Grina str, Moscow, 117216, Russia

<sup>3</sup> Dagestan State University, 4, Batyraya str, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000, Russia <sup>4</sup> Dagestan State Medical University, 1, Lenina str, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367012, Russia

E-mail: marchenko.mariya2018@yandex.ru; dagfarm@mail.ru

The article presents new approaches to standardization of dry extract and medicinal preparations (MD) of ginkgo biloba. Methods for the spectrophotometric determination of flavonoids, terpenolactones and ginkgoic acids in the active pharmaceutical substance "Ginkgo biloba dry extract" (further in the text "ginkgo extract"), as well as methods for analysis of MD "GINKGO, tablets coated with 40 mg" ("GINKGO", Tablets) and "GINKGO, solution for enteral use, 40 mg/ml" ("GINKGO, solution"). **The aim** – development and validation of methods for standardization of plant-derived APS – ginkgo extract, as well as MD based on it. **Materials and methods.** The samples of the APS "Ginkgo biloba dry extract", MD "GINKGO, tablets" and "GINKGO, solution", produced by CJSC "VIFITEH" (Russia) served as the objects of the study. Research methods: spectrophotometry (further in the text "SF-metry") and high-performance liquid chromatography (HPLC). Used equipment: SF-56 spectrophotometer manufactured by LLC "LOMO-SPECTR" (Russia) and liquid chromatograph of the brand Shimadzu Prominence LC-20AD (Japan) with software control and computer processing of analysis results. **Results and discussion.** The use of the method of SF-metry optimizes the analysis process not only during the standardization of the finished product, but also at all stages of industrial production of MD within the framework of interoperational control. The content of the sum of flavonoids in the samples of two series of ginkgo extract in terms of rutine was determined by direct SF-metry –  $(29.64 \pm 0.36)\%$  and  $(28.88 \pm 0.54)\%$ ; method of differential SF-metry –  $(21.78 \pm 0.41)$  and  $(20.98 \pm 0.24)\%$ . The content of the amount of flavonoids in the preparations "GINKGO, tablets" and "GINKGO, solution" was: by direct SF-metry –  $(9.84 \pm 0.15)$  mg/tab. and  $(10.07 \pm 0.10)$  mg/ml; Method of differential SF-metry –  $(7.33 \pm 1.13)$  mg/tab. and  $(8.30 \pm 0.13)$  mg/ml, respectively. The analogues "MEMOPLANT" ("Dr. Willimar Schwabe GmbH & Co. KG") and "TANAKAN®" ("Beaufour Ipsen Industrie") were analyzed – the results obtained are comparable. Methods for quantitative determination of the amount of terpenolactones in the APS by the method of differential SF-metry and the residual content of the sum of ginkgoic acids by the direct SF-metry method are developed. During their approbation it was found that the amount of ginkgolactones in the samples studied is  $7.87 \pm 0.17\%$  and  $8.03 \pm 0.22\%$ , calculated as bilobalide, and the residual content of ginkgoic acid does not exceed 10 ppm. The expediency and effectiveness of using the HPLC method for simultaneous determination of the authenticity and evaluation of the benign nature of the substance and MD ginkgo was confirmed. **Conclusion.** The methods of the SF metric quantification of the amount of funds have been developed. The developed methods meet the validation tests, are characterized by accuracy and reproducibility in combination with simplicity of execution and are tested in the conditions of pharmaceutical production.

**Keywords:** Ginkgo extract, ginkgofavonglycosides, terpenolactones, ginkgolic acids, spectrophotometry

**Введение.** Ноотропы – фармакологическая группа лекарственных препаратов (ЛП), которые оказывают специфическое позитивное влияние на высшие интегративные функции мозга человека, умственную деятельность, повышают устойчивость к различным повреждающим факторам, снижают неврологический дефицит и улучшают кортико-субкортикальные связи [1, 2]. В современном ассортименте ноотропных средств особое место принадлежит препаратам растительного происхождения, которые при правильном применении действуют не менее эффективно, чем синтетические или полусинтетические аналоги, при этом они, как правило, не вызывают побочные эффекты. Среди них выделяют ЛП на основе гинкго двулопастного листьев экстракта (*Extractum foliorum Ginkgo bilobae*), характеризующиеся цереброваскулярной активностью.

Реализация фармакологического эффекта препаратов гинкго происходит через опосредованное воздействие на нервную клетку, обусловленное улучшением как системного мозгового кровотока, так и микроциркуляции, а также антиагрегантным и антигипоксическим действием [3, 4, 5].

Гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.) – голосеменное листопадное реликтовое дерево, которое является единственным современным представителем сем. Гинкговые (Ginkgoaceae). Листья гинкго включены в Российскую, Европейскую и Британскую фармакопеи и служат сырьем для производства ряда ЛП (Танакан, Мемоплант, Билобил, Гинкго-Форт и др.) и биологически активных добавок (БАД) к пище, которых насчитывается несколько десятков наименований. Однако, в силу различных причин, в том числе относительно

высокой стоимости конечного продукта, спрос на данные препараты остается нереализованным [1, 6, 7, 8]. В связи с вышеизложенным, задача создания российских ЛП на основе экстракта гинкго, не уступающих по качеству, эффективности и безопасности зарубежным аналогам, весьма актуальна. Созданию импортозамещающих ЛП из листьев гинкго препятствуют такие факторы, как необеспеченность лекарственным растительным сырьем и стандартными образцами (СО), в ряде случаев сложность проведения методик анализа и др.

Анализу экстракта гинкго и его препаратов посвящен ряд исследований [9, 10, 11, 12, 13]. В большинстве методик, предложенных ранее, основное внимание уделяется двум классам биологически активных веществ (БАВ): флавоноидным гликозидам, объединенным под общим названием «гинкгофлавоногликозиды», «гинкгозиды», «гинкгофлавоны», и терпенолактонам, которые также объединяют под групповым названием «гинкголиды», «гинкголактоны», «билобалиды» [14, 15, 16]. В публикациях последних лет отмечается потенциальная опасность неконтролируемого применения неочищенного экстракта гинкго, связанная с проявлением ряда побочных эффектов, в частности, аллергических реакций и токсического воздействия на желудочно-кишечный тракт, что обусловлено присутствием т.н. гинкголевых кислот. В связи с тем, что минимальный курс терапии препаратами гинкго составляет три месяца, а может достигать шести и более месяцев, экстракт гинкго рекомендовано дополнительно нормировать по уровню предельно допустимого содержания суммы гинкголевых кислот (по различным источникам не более 5 мг/кг или не более 10 мг/кг) [7, 17, 18,].

Фармацевтическая компания ЗАО «ВИФИТЕХ» воспроизводит технологию АФС – сухого экстракта листьев гинкго двулопастного и внедряет в ассортимент ЛП «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор». Технология заключается в экстракции листьев гинкго ацетоном 60% с последующими фракционированием и селективной очисткой от малополярных веществ, в т.ч. от гинкголевых кислот. В результате препараты являются полными аналогами ЛП «МЕМОПЛАНТ, таблетки, 40 мг» («Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG», Германия), «ТАНАКАН®», таблетки, 40 мг», и «ТАНАКАН®, раствор, 40 мг/мл» («Beaufour Ipsen Industrie», Франция), которые зарегистрированы и применяются на территории РФ свыше 20 лет [1, 6].

**Цель работы** – разработка и валидационная оценка методик стандартизации АФС растительного происхождения – сухого экстракта из листьев гинкго двулопастного и лекарственных препаратов на его основе.

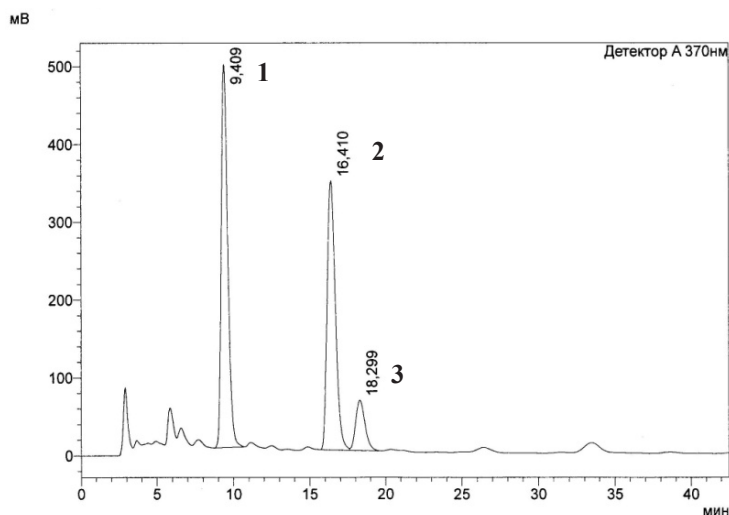
**Материалы и методы.** Объектами исследования являются образцы АФС «Гинкго двулопастного экстракт сухой», ЛП «ГИНКГО, таблетки» и «ГИНКГО, раствор», произведенные компанией ЗАО «ВИФИТЕХ». Методы исследования: СФ-метрия в УФ- и видимой области (спектрофотометр СФ-56, ООО «ЛОМО-СПЕКТР», Россия), ВЭЖХ-хроматография в следующих условиях: хроматограф жидкостный с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа марки Shimadzu Prominence LC-20AD (Япония) с дегазатором DGU-20A3R и УФ-ВИД-детектором Shimadzu SPD-20A; хроматографическая колонка – Zorbax EclipseXDB-C18 размером 4,6 × 250 мм и размером частиц сорбента 5 мкм; подвижная фаза – смесь из ортофосфорной кислоты раствора 0,5 % и ацетонитрила для хроматографии (70:30); длина волны детектирования – 370 нм.

**Результаты и обсуждение.** Согласно данным литературы, флавоноиды экстракта гинкго представлены гликозидами, производными кверцетина, кемпферола и изорамнетина, а также конденсированными по связи C<sub>8</sub>–C<sub>3</sub> бифлавоноидами [15, 19].

Обнаружение флавоноидов в исследуемых объектах осуществляли посредством цианидиновой пробы [16], которая позволяет быстро и надежно идентифицировать их, как в АФС, так и в ЛП. Подтверждением подлинности исследуемых объектов также является наличие характеристических пиков агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина на ВЭЖХ-хроматограмме (рис. 1). Гидролиз флавоногликозидов в ходе пробоподготовки проводили в присутствии хлористоводородной кислоты при нагревании реакционной смеси в течение 2 ч в среде этилового спирта.

На этапе разработки и апробации методики ВЭЖХ-анализа принадлежность пиков на хроматограммах анализируемых веществ подтверждали использованием растворов СО кверцетина, кемпферола и изорамнетина (Sigma Aldrich). Анализ полученных экспериментальных данных показал, что с целью упрощения процедуры стандартизации субстанции и ЛП гинкго методом ВЭЖХ, для выявления на хроматограмме характеристических пиков достаточно использовать только СО кверцетина, обнаружение которого позволяет идентифицировать пики кемпферола (соотношение, рассчитанное как  $\frac{t_{\text{уд. вещества}}}{t_{\text{уд. кверцетина}}}$  – около 1,9) и изорамнетина ( $\frac{t_{\text{уд. вещества}}}{t_{\text{уд. кверцетина}}}$  – около 2,1).

Фармакопея США (USP) дополнительно предусматривает контроль соотношения площадей пиков флавоноидных агликонов кверцетина и кемпферола, которое в доброкачественном продукте не должно превышать 2,5:1; этот показатель исключает введение в состав продукта более доступных веществ – рутина или кверцетина, с целью увеличения содержания флавоноидной фракции [18].



**Рисунок 1 – Обнаружение агликонов флавоноидов экстракта гинкго методом ВЭЖХ.**  
**Условные обозначения: 1 – пик кверцетина; 2 – пик кемпферола; 3 – пик изорафнетина.**

Содержание суммы флавоноидов в экстракте и препаратах гинкго определяют методами СФ-метрии и ВЭЖХ [20, 13]. Метод ВЭЖХ предусматривает суммирование площадей пиков агликонов кверцетина, кемпферола и изорафнетина на хроматограмме гидролизата, полученный результат пересчитывается на сумму флавоноидных гликозидов через площадь пика раствора СО кверцетина и поправочный коэффициент. Методика воспроизводится, позволяет селективно оценивать анализируемый класс веществ, однако зависит от полноты протекания гидролиза флавоногликозидов, трудоемка в исполнении и требует значительных затрат во времени. В условиях промышленного производства дозированных ЛП, в частности, таблеток и раствора, методика ВЭЖХ-анализа может значительно влиять на скорость процессов межоперационного контроля, а именно таблетированной массы, ядер таблеток, промежуточных полупродуктов или растворов; позволяет стандартизировать анализируемый объект только лишь по предельно допустимому нижнему уровню количественного содержания суммы флавоноидов. Преимуществом методики является возможность одновременного определения подлинности и доброкачественности субстанции.

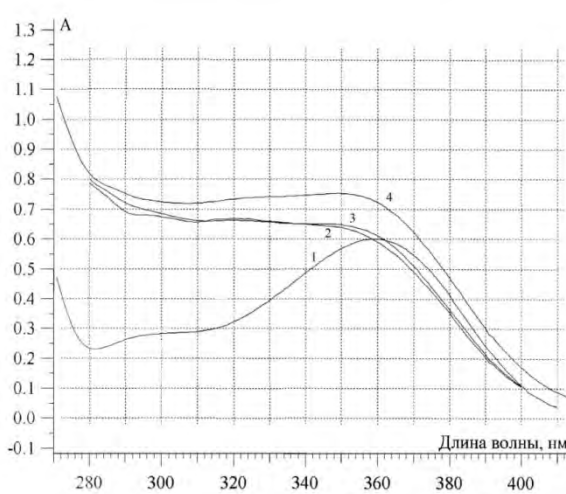
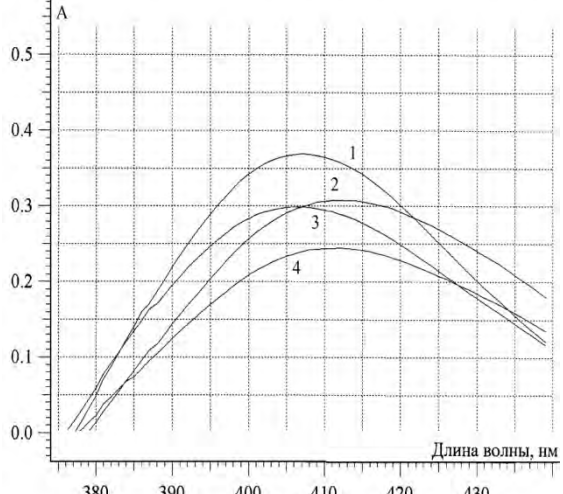
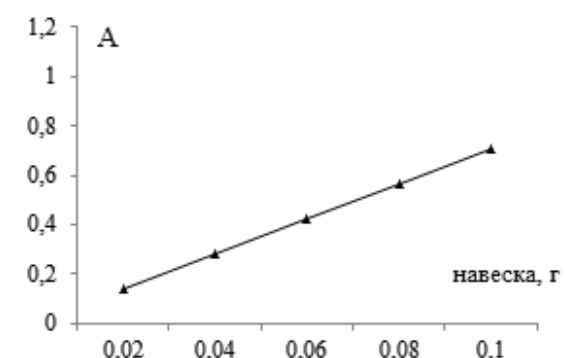
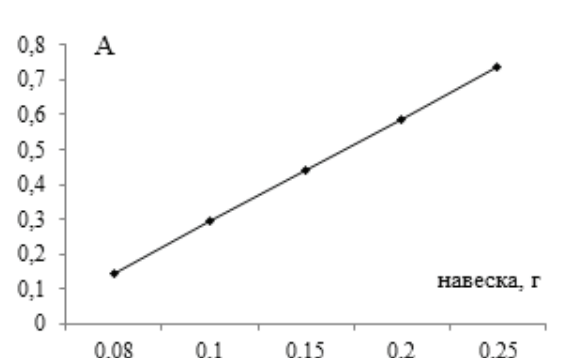
Количественное определение суммы флавоноидов в экстракте и препаратах гинкго апробировали параллельно по методикам прямой и дифференциальной СФ-метрии. Отличия в подходах реализации методик заключаются в пробоподготовке. В варианте прямой СФ-метрии оптическая плотность измеряется у раствора вещества или суммы веществ в их исходном состоянии, не измененном в ходе какой-либо реакции, и измерение производится относительно растворителя, как правило, бесцветного и прозрачного. В варианте дифференциальной СФ-метрии определение проводится по продуктам химических превращений анализируемого вещества или суммы веществ, измерение проводится относительно раствора, приготовленного аналогично испытуемому, но без добавления реагента, комплексобразователя,

окислителя и др. Применительно к экстракту и ЛП гинкго, в варианте прямой СФ-метрии сумма анализируемых веществ соответствует селективному извлечению – преимущественно фракции флавоноидов, в варианте дифференциальной СФ-метрии – комплексам флавоноидов с катионами алюминия (III), образующимся в слабокислой среде.

УФ-спектры поглощения испытуемых растворов из экстракта гинкго и его ЛП в условиях прямой СФ-метрии имеют т.н. «плечо» или слабо выраженный максимум в области (340 – 375) нм; УФ-спектры поглощения испытуемых растворов в условиях дифференциальной СФ-метрии имеют максимумы в интервале от 405 до 415 нм (табл. 1). В ходе испытаний установлено, что зависимость величин оптической плотности испытуемых растворов от навески экстракта гинкго соответствует валидационному критерию линейности, что позволяет считать оба варианта методики пригодными для стандартизации препаратов гинкго.

В качестве стандартного образца в обеих методиках использовали СО рутина (Sigma Aldrich), имеющий в условиях анализа максимумы поглощения при длинах волн  $(362 \pm 5)$  нм и  $(410 \pm 5)$  нм, соответственно. Растворы СО рутина, как в прямой, так и в дифференциальной СФ-метрии, демонстрируют воспроизводимость величины оптической плотности, это послужило основанием для расчета величин удельного показателя поглощения ( $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ) рутина в условиях анализа (табл. 1). Относительная ошибка определения удельного показателя поглощения не превышает 2%, что позволяет использовать установленные величины в расчетах. Как известно, использование точно установленного показателя позволяет значительно сократить продолжительность анализа, снизить величину и вероятность ошибки определения, а также проводить стандартизацию в условиях отсутствия или нехватки СО рутина, что немаловажно для текущего межоперационного контроля на производстве.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика вариантов количественного определения суммы флавоноидов в экстракте гинкго методом СФ-метрии

| Спектрофотометрия                                                                                                                                                                                                                                                                   |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------|--------|------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------|--------|------|------|
| Прямая                                                                                                                                                                                                                                                                              |   |      |        |      |      | Дифференциальная                                                                                                                                                                                                              |   |      |        |      |      |
| 1. УФ-спектры поглощения испытуемых растворов, согласно методикам определения суммы флавоноидов в экстракте и препаратах гинкго                                                                                                                                                     |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
|                                                                                                                                                                                                    |   |      |        |      |      |                                                                                                                                             |   |      |        |      |      |
| <p>Условные обозначения: 1 – испытуемый раствор СО рутина; 2 – испытуемый раствор из ЛП «ГИНКГО, раствор»; 3 – испытуемый раствор из ЛП «ГИНКГО, таблетки»; 4 – испытуемый раствор из субстанции «Гинкго двулопастного экстракт сухой»</p>                                          |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
| 2. Зависимость оптической плотности от навески по методикам определения суммы флавоноидов в экстракте гинкго                                                                                                                                                                        |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
|                                                                                                                                                                                                  |   |      |        |      |      |                                                                                                                                           |   |      |        |      |      |
| 3. Величины удельного показателя поглощения (A <sub>1см</sub> <sup>1%</sup> ) рутина                                                                                                                                                                                                |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
| X <sub>ср</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                     | f | P    | S      | Δx   | ε, % | X <sub>ср</sub>                                                                                                                                                                                                               | f | P    | S      | Δx   | ε, % |
| 311,6                                                                                                                                                                                                                                                                               | 5 | 0,95 | 2,1323 | 5,48 | 1,76 | 186,0                                                                                                                                                                                                                         | 5 | 0,95 | 1,3969 | 3,59 | 1,93 |
| 4. Методики определения суммы флавоноидов в экстракте гинкго                                                                                                                                                                                                                        |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
| Приготовление испытуемого раствора А                                                                                                                                                                                                                                                |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
| К 0,1 г (точная навеска) субстанции прибавляют 30 мл спирта 50% и перемешивают на магнитной мешалке или шейкере в течение 5 мин. Раствор количественно с помощью спирта 50% переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, затем объем доводят тем же спиртом до метки и перемешивают |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
| Приготовление испытуемого раствора Б                                                                                                                                                                                                                                                |   |      |        |      |      |                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |      |      |
| 2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты раствора 1%, доводят спиртом 70% до метки и перемешивают                                                                                                                           |   |      |        |      |      | 1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл алюминия (III) хлорида спиртового раствора 2%, 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30%, затем доводят объем спиртом 50% до метки и перемешивают |   |      |        |      |      |

Продолжение таблицы 1

| Условия спектрофотометрирования испытуемого раствора Б                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| При длине волны 362 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | При длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм                                               |
| Раствор сравнения                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                     |
| Раствор спирта этилового 70 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Раствор, приготовленный аналогично раствору Б, но без добавления раствора алюминия (III) хлорида 2% |
| <p>Формула расчета содержания суммы флавоноидов в субстанции в пересчете на рутин и сухое вещество (X) в процентах</p> $X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{311,6 \cdot a \cdot (100 - W)},$ $X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{186 \cdot a \cdot (100 - W)},$ <p>где А – оптическая плотность испытуемого раствора Б;<br/> <math>A_{1\text{см}}^{1\%}</math> – удельный показатель поглощения рутина в условиях анализа;<br/> а – навеска субстанции, г;<br/> W – потеря в массе при высушивании субстанции, %.</p> |                                                                                                     |

При анализе ЛП, содержащих экстракт гинкго, в методики внесены незначительные изменения на стадии пробоподготовки, касающиеся необходимости коррекции навески и дополнительной фильтрации раствора А. Результаты многочисленных исследований подтвердили возможность применения метода СФ-метрии в двух вариантах для определения суммы флавоноидов, так как во всех испытаниях относительная ошибка определения не превышала 2,0 % (табл. 4).

Аналогично были разработаны методики СФ-метрического определения суммы терпенолактонов и суммы гинкголевых кислот с целью количественной оценки.

Терпенолактоны гинкго представлены сескви- и дитерпеновыми производными. Данная группа БАВ характеризуется отсутствием выраженных полос

поглощения, что явилось обоснованием разработки их количественного определения методом дифференциальной СФ-метрии по реакции с окисляющим реактивом по аналогии с ранее описанной [21]. Пробоподготовка предусматривает селективное выделение из экстракта гинкго терпеноидной фракции неполярным хлорсодержащим органическим растворителем. В качестве стандартного образца использовали билобалид (*Bilobalide from Ginkgo biloba leaves, Sigma Aldrich*), который в присутствии концентрированной серной кислоты образует соединение с выраженным максимумом поглощения при длине волны (292 ± 5) нм. Суммарный УФ-спектр продуктов окисления терпенолактонов экстракта гинкго в условиях анализа показал максимумы поглощения при (267 ± 5) нм и (295 ± 5) нм (рис. 2).

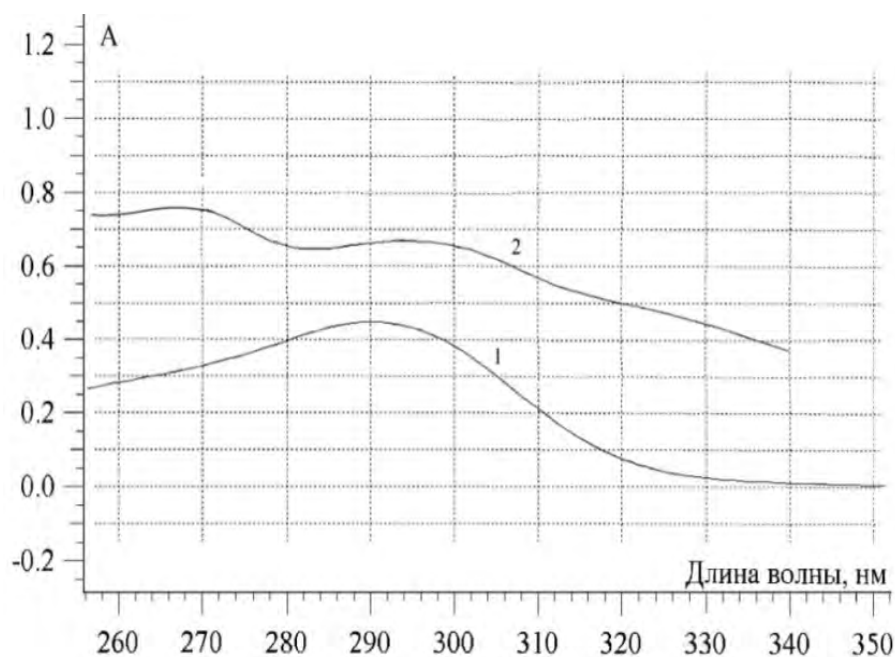


Рисунок 2 – УФ-спектры поглощения продуктов окисления билобалида (1) и суммы терпенолактонов экстракта гинкго (2) серной кислотой концентрированной

Зависимость оптической плотности испытуемых растворов от навески экстракта гинкго имеет линей-

ный характер (рис. 3), что является надежным критерием для применения данного подхода.

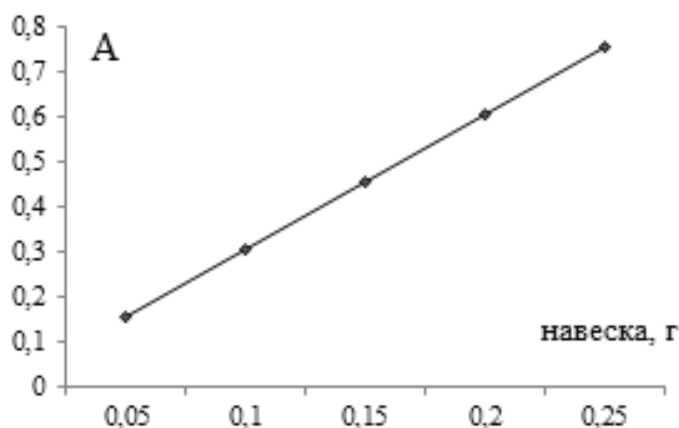


Рисунок 3 – Зависимость оптической плотности испытуемого раствора от навески экстракта гинкго в методике количественного определения суммы терпенолактонов

При разработке методики был рассчитан удельный показатель поглощения ( $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ) билобалида, который в условиях анализа составил 9,8 ( $f = 5$ ;  $P = 0,95$ ). Относительная ошибка определения составила 2,98%, что позволяет использовать рассчитанный показатель в стандартизации экстракта.

Методика определения суммы терпенолактонов в сухом экстракте гинкго методом СФ-метрии представлена в табл. 2. Она была апробирована на образцах сухого экстракта гинкго производства

ЗАО «ВИФИТЕХ». Анализ проводили в шести повторностях, полученные результаты обрабатывали статистическим методом; относительная ошибка определения не превышает 3,0%. Установлено, что содержание суммы терпенолактонов в экстракте гинкго, определяемое СФ-метрическим методом, позволяет нормировать данный показатель на уровне «не менее 6,0%», что соответствует ранее установленным международным требованиям (табл. 4) [18, 20].

Таблица 2 – Методика количественного определения суммы терпенолактонов в экстракте гинкго

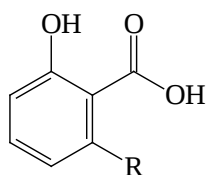
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <i>Приготовление испытуемого раствора А</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| К 0,2 г (точная навеска) субстанции прибавляют 40 мл хлороформа и перемешивают в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре (60-70) °С. Затем смесь фильтруют с 2,0 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки вместимостью 250 мл. Коническую колбу и фильтр количественно промывают хлороформом 2 раза порциями по 15 мл. Хлороформное извлечение упаривают на роторном испарителе под вакуумом при температуре (50-60)°С до полного удаления органического растворителя. Остаток растворяют в 5 мл хлороформа при слабом нагревании на водяной бане и переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл. Колбу для отгонки количественно промывают тем же растворителем дважды порциями по 2 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят хлороформом до метки и перемешивают |  |
| <i>Приготовление испытуемого раствора Б</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| 5,0 мл раствора А помещают в колбу для отгонки вместимостью 50 мл и упаривают на роторном испарителе под вакуумом при температуре (50-60)°С до полного удаления органического растворителя. Остаток смешивают с 5 мл серной кислоты концентрированной, которые затем переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, колбу ополаскивают 3 мл кислоты, которые присоединяют к основному объему в мерной колбе. Объем раствора доводят до метки серной кислотой концентрированной и перемешивают                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| Условия спектрофотометрирования испытуемого раствора Б – При длине волны 295 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
| <i>Раствор сравнения – кислота серная концентрированная</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
| <p><i>Формула расчета содержания суммы терпенолактонов в субстанции</i></p> <p><i>В пересчете на билобалид и сухое вещество (X) в процентах:</i></p> $X = \frac{A \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)},$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |

Продолжение таблицы 2

|     |                        |   |                                                               |
|-----|------------------------|---|---------------------------------------------------------------|
| где | A                      | — | Оптическая плотность испытуемого раствора Б                   |
|     | $A_{1\text{см}}^{1\%}$ | — | удельный показатель поглощения билобалида в условиях анализа; |
|     | a                      | — | навеска субстанции, г;                                        |
|     | W                      | — | потеря в массе при высушивании субстанции, %.                 |

Важнейшей особенностью экстракта гинкго является возможное присутствие в его составе т.н. гинкголевых кислот, поэтому технология его промышленного производства предусматривает жидкость-жидкостную экстракцию *n*-гептаном или другим подходящим экстрагентом с целью их удаления.

Потенциальное побочное влияние гинкголевых кислот определяет необходимость контроля их остаточного содержания в субстанции с целью обеспечения безопасности ЛП. По свойствам и химической структуре гинкголевые кислоты являются малополярными 6-алкилпроизводными салициловой кислоты (рис. 4).



R =  $-\text{C}_{13}\text{H}_{27}-$  гинкголевая кислота GA C 13:0 (6-тридецил-салициловая кислота);  
 R =  $-\text{C}_{15}\text{H}_{29}-$  гинкголевая кислота GA C 15:1 (анакардиевая кислота;  
 6-пентадецил-салициловая кислота);  
 R =  $-\text{C}_{15}\text{H}_{31}-$  гинкголевая кислота GA C 15:0 (6-пентадецил-салициловая кислота);  
 R =  $-\text{C}_{17}\text{H}_{31}-$  гинкголевая кислота GA C 17:1 (6-гептадецил-салициловая кислота)

Рисунок 4 – Гинкголевые кислоты, идентифицированные в листьях гинкго двуплодного

При разработке методики испытаний были учтены их физико-химические свойства (табл. 3). Экстрагентом анализируемой фракции для обработки навески сухого экстракта гинкго в ходе пробоподготовки был выбран *n*-гептан, который позволяет исключить мешающее влияние как сопутствующих полярных соединений, так и терпенолактонов, которые нерастворимы в данном экстрагенте. В качестве стандартного образца мы использовали 6-тридецил-салициловую кислоту (*Ginkgolic acid* (GA) C 13:0, *Sigma Aldrich*). Раствор GA C 13:0 имеет выраженный максимум по-

глощения при длине волны ( $311 \pm 2$ ) нм, которая была принята нами в качестве аналитической в методике спектрофотометрического определения. Навеска анализируемой субстанции подобрана так, что при наличии остаточного количества суммы гинкголевых кислот более 10 ppm (0,001 %), оптическая плотность испытуемого раствора будет превышать 0,167, а на УФ-спектре будет присутствовать т.н. «плечо» или максимум. В образцах экстракта, прошедших испытания, содержание суммы гинкголевых кислот соответствует установленной норме (рис. 5).

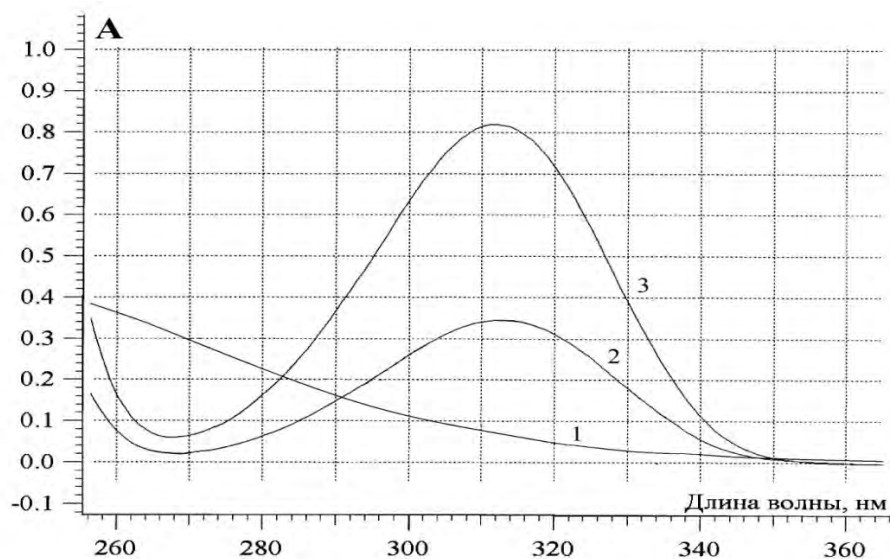


Рисунок 5 – УФ-спектры поглощения испытуемого раствора экстракта гинкго и растворов СО гинкголевой кислоты

Условные обозначения:

- 1 – испытуемый раствор экстракта гинкго;  
 2 – раствор СО гинкголевой кислоты GA C 13:0 0,520 мг/мл;  
 3 – раствор СО гинкголевой кислоты GA C 13:0 0,208 мг/мл.

**Таблица 3 – Методика испытания сухого экстракта гинкго  
на остаточное содержание суммы гинкголевых кислот**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <i>Приготовление испытуемого раствора</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
| 15,000 г порошка субстанции, предварительно высушенной в течение 5 ч, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют около 100 мл <i>n</i> -гептана и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Смесь фильтруют с 2 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки вместимостью 250 мл. Коническую колбу и фильтр промывают 20 мл <i>n</i> -гептана, которые присоединяют к основному раствору. Фильтрат упаривают на ротационном испарителе при температуре (75-85)°С до полного удаления органического растворителя. Остаток смешивают с 5 мл <i>n</i> -гептана, затем количественно с помощью того же растворителя переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят гептаном до метки, перемешивают и фильтруют |  |
| <i>Условия спектрофотометрирования испытуемого раствора –</i><br>При длине волны 311 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| Раствор сравнения – <i>n</i> -гептан                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
| Нормирование:<br>Оптическая плотность испытуемого раствора должна быть не более 0,167<br>(содержание суммы гинкголевых кислот в пересчете на гинкголевую кислоту С 13:0 – не более 0,001%)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |

Экспериментальные данные, полученные в лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ», подтвердили результативность применения метода СФ-метрии для оценки остаточного содержания суммы гинкголевых кислот в субстанции, нормируемых по верхнему пределу. Относительная ошибка проведенных испытаний не превышает 2,0%.

В ходе апробации в условиях фармацевтического производства было установлено, что разработанные методики для показателей подлинности, соотношения кверцетина и кемпферола, испытания на содержание суммы гинкголевых кислот, количественное определение суммы флавоноидов (гинкгофлавоногликозидов) и суммы терпенолактонов включены в НД на субстанцию «Гинкго дву-

лопастного экстракт сухой» (ЗАО «ВИФИТЕХ») и являются обязательными для ее стандартизации. Применительно к лекарственным формам, содержащим стандартизованный экстракт гинкго, в анализе по показателю «Количественное определение», целесообразно ограничиться оценкой содержания суммы флавоноидов, так как этот показатель достаточно информативный, характеризуется точностью, воспроизводимостью и простотой исполнения, что очень важно для межоперационного контроля полупродуктов. Кроме того, на данный показатель значительно меньшее влияние способны оказывать вспомогательные компоненты, входящие в состав ЛП. Результаты апробации методик представлены в табл. 4, 5 и 6.

**Таблица 4 – Результаты апробации методик стандартизации субстанции  
«Гинкго двулопастного экстракт сухой» (ЗАО «ВИФИТЕХ»)**

| Показатель качества                                                       |                                  | Результат испытания субстанции                                                                                                                                           |                             |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                                                           |                                  | Образец 1<br>(сер. 011216)                                                                                                                                               | Образец 2<br>(сер. 021216)  |
| Качественная реакция на флавоноиды                                        |                                  | Положительная                                                                                                                                                            | Положительная               |
| Обнаружение в гидролизате агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина |                                  | Выдерживают испытание – на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемых растворов присутствуют пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина, кемпферола и изорамнетина |                             |
| Соотношение кверцетина и кемпферола                                       |                                  | 1,31                                                                                                                                                                     | 1,22                        |
| Содержание суммы флавоноидов, %                                           | Метод прямой СФ-метрии           | 29,64 ± 0,36<br>(ε = 1,21%)                                                                                                                                              | 28,88 ± 0,54<br>(ε = 1,87%) |
|                                                                           | Метод дифференциальной СФ-метрии | 21,78 ± 0,41<br>(ε = 1,88%)                                                                                                                                              | 20,98 ± 0,24<br>(ε = 1,14%) |
| Содержание суммы терпенолактонов, %                                       |                                  | 7,87 ± 0,17<br>(ε = 2,16 %)                                                                                                                                              | 8,03 ± 0,22<br>(ε = 2,74 %) |
| Испытание на остаточное содержание суммы гинкголевых кислот, %            |                                  | Выдерживает испытание                                                                                                                                                    | Выдерживает испытание       |

**Таблица 5 – Результаты апробации методик стандартизации таблеток  
с экстрактом гинкго**

| Показатель качества                                                       |                                  | Результат испытания таблеток                                                                                                                                             |                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                                                                           |                                  | «ГИНКГО, таблетки»<br>(ЗАО «ВИФИТЕХ»),<br>Россия                                                                                                                         | «МЕМОПЛИАНТ,<br>таблетки, покрытые<br>оболочкой, 40 мг»,<br>Германия |
| Качественная реакция на флавоноиды                                        |                                  | Положительная                                                                                                                                                            | Положительная                                                        |
| Обнаружение в гидролизате агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина |                                  | Выдерживают испытание – на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемых растворов присутствуют пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина, кемпферола и изорамнетина |                                                                      |
| Соотношение кверцетина и кемпферола                                       |                                  | 0,21                                                                                                                                                                     | 1,3                                                                  |
| Содержание суммы флавоноидов, мг/таб.                                     | Метод прямой СФ-метрии           | 9,84±0,15<br>(ε=1,56%)                                                                                                                                                   | 8,6±0,11<br>(ε=1,34%)                                                |
|                                                                           | Метод дифференциальной СФ-метрии | 7,33±1,13<br>(ε=1,76%)                                                                                                                                                   | 6,84±0,13<br>(ε=1,85%)                                               |

**Таблица 6 – Результаты апробации методик стандартизации раствора  
с экстрактом гинкго**

| Показатель качества                                                       |                                  | Результат испытания раствора                                                                                                                                             |                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                           |                                  | «ГИНКГО, раствор»<br>(ЗАО «ВИФИТЕХ»), Россия                                                                                                                             | «ТАНАКАН®, раствор<br>для приема внутрь,<br>40 мг/мл» («Beaufour Ipsen<br>Industrie»), Франция |
| Качественная реакция на флавоноиды                                        |                                  | Положительная                                                                                                                                                            | Положительная                                                                                  |
| Обнаружение в гидролизате агликонов кверцетина, кемпферола и изорамнетина |                                  | Выдерживают испытание – на ВЭЖХ-хроматограмме испытуемых растворов присутствуют пики, соответствующие по времени удерживания пикам кверцетина, кемпферола и изорамнетина |                                                                                                |
| Соотношение кверцетина и кемпферола                                       |                                  | 1,31                                                                                                                                                                     | 1,37                                                                                           |
| Содержание суммы флавоноидов, мг/мл                                       | Метод прямой СФ-метрии           | 10,07 ± 0,1<br>(ε = 1,03 %)                                                                                                                                              | 9,63 ± 0,11<br>(ε = 1,17 %)                                                                    |
|                                                                           | Метод дифференциальной СФ-метрии | 8,30 ± 0,13<br>(ε = 1,57 %)                                                                                                                                              | 7,81 ± 0,11<br>(ε = 1,44 %)                                                                    |

**Заключение.** Предложены методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов, терпенолактонов и гинкголевых кислот, нормируемых при стандартизации АФС растительного происхождения – «Гинкго двулопастного экстракт сухой»; технология которой воспроизведена фармацевтической компанией ЗАО «ВИФИТЕХ» (Россия). Все методики разработаны с учетом физико-химических свойств определяемых классов БАВ, отвечают современным требованиям, адаптированы к условиям промышленного производства и контроля качества. Подтверждена эффективность метода ВЭЖХ для одновременной идентификации и оценки доброкачественности экстракта и препаратов гинкго.

Проведена сравнительная оценка спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в различных вариантах, которые характеризуются точностью и воспроизводимостью в сочетании с простотой исполнения. Методики анализов апробированы в контрольно-аналитической лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ», полученные результаты прошли валидационную оценку по основным критериям, которые показали возможность их применения как для межоперационного контроля полупродуктов, так и для стандартизации готовых продуктов, получаемых из листьев гинкго двулопастного – экстракта сухого и ЛП «ГИНКГО, таблетки покрытые оболочкой, 40 мг» и «ГИНКГО, раствор для приема внутрь, 40 мг/мл».

**Introduction.** Nootropics are a group of drugs that have a specific positive effect on the higher integrative functions of the human brain, mental activity, increase resistance to various damaging factors, reduce neurological deficits and improve cortic-subcortical connections [1, 2]. In a modern range of nootropics drugs, a special place belongs to preparations of plant origin that, when properly applied, are no less effective than synthetic or semi-synthetic analogs, and they are usually side effects are minimized. Among them, preparations based on ginkgo biloba leaf extract (*Extractum foliorum Ginkgo bilobae*), characterized by cerebrovascular activity, are distinguished. The realization of the pharmacological effect of ginkgo drugs occurs through an indirect effect on the nerve cell due to the improvement of cerebral blood flow and microcirculation, antiaggregant and antihypoxic effect [3, 4, 5].

Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba L.*) is a gymnosperm relict deciduous tree, which is the only modern representative of the family Ginkgolide (*Ginkgoaceae*). Ginkgo leaves are included in the Russian, European and British pharmacopoeias and serve as raw materials for the production of a number of drugs (Tanakan, Memoplant, Bilobil, Ginkgo-Fort, etc.) and biologically active additives (BAA) for food, which number several dozen names. However, due to various reasons, including the relatively high cost of the final product, the demand for these products remains unrealized [1, 6, 7, 8]. Proceeding from the above, the need to create Russian MP that are not inferior in quality, efficiency and safety to foreign analogues is very relevant. The creation of import-substituting drugs is hampered by such factors as the lack raw materials, lack of standard samples (CS), in a number of cases the complexity of conducting analysis techniques, etc.

For an analysis of extract of ginkgo and its preparations are devoted a number of studies [9, 10, 11, 12, 13]. In most of the techniques proposed earlier, the focus has been on two classes of substances: flavonoidal glycosides, collectively known as "ginkgo flavonglycosides," "ginkgozides," "ginkgo flavones" and terpenolactones, which also are grouped under the name ginkgolides, ginkgolactones, "Bilobalides" [14, 15, 16]. In the recent publications, there has been a potential danger of uncontrolled use of the crude ginkgo extract, which is associated with a number of side effects, in particular, allergic reactions and toxic effects on the gastrointestinal tract, which occur due to the presence of the so-called. ginkgolic acids. Due to the fact that the minimum length of therapy with ginkgo drugs is three months, but it could reach six months or more, it is recommended for the extract of ginkgo to be additionally normalized according to the level of the maximum allowed content of ginkgoic acid (according to various sources, not more than 5 mg / kg or not more than 10 mg / kg) [7, 17, 18].

Pharmaceutical company CJSC "VIFITEH" reproduces the APS technology of the dry extract of leaves ginkgo biloba and introduces into the assortment of MP: "GINKGO, coated tablets, 40 mg" and "GINKGO, solution for enteral use, 40 mg / ml." The technology based

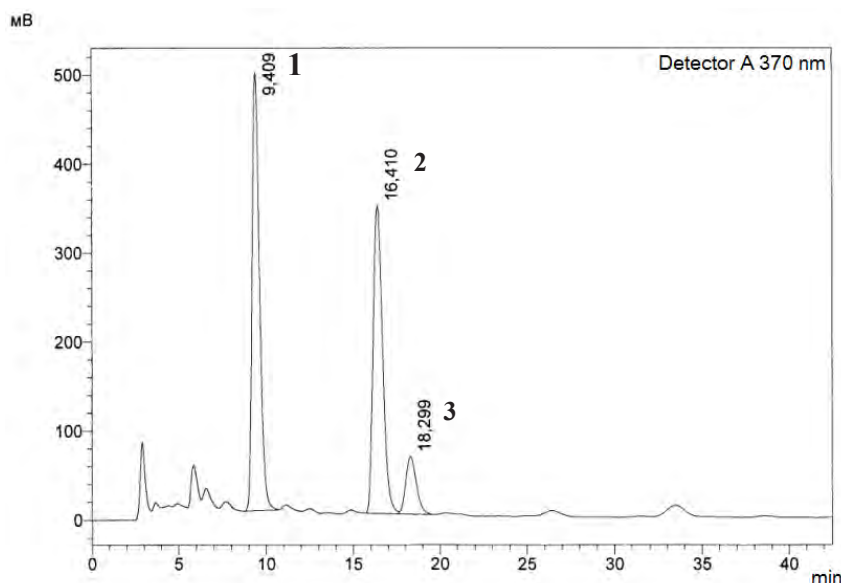
on the extraction of ginkgo leaves with 60% acetone, followed by fractionation and selective purification from low-polar substances, including from ginkgoic acids. As a result, the preparations become full analogues of drugs "MEMOPLANT, tablets coated with a film coating of 40 mg" ("Dr. Willimar Schwabe GmbH & Co. KG", Germany), "TANAKAN®, tablets coated with 40 mg", and "TANACAN®, solution for ingestion of 40 mg / ml" ("Beaufour Ipsen Industrie", France), which are registered and used in Russian Federation for more than 20 years [1, 6].

**The aim** – is the development and validation of methods for standardizing of APS – dry extract, and ginkgo biloba preparations.

**Materials and methods.** The subjects of the study are samples of the APS "Ginkgo biloba dry extract" and MP – "GINKGO, coated tablets, 40 mg" and "GINKGO, solution for the enteral use, 40 mg/ml" of the Company CJSC "VIFITEH". Research methods: spectrophotometry in the UV and visible range (spectrophotometer SF-56, manufactured by LLC LOMO-SPECTR, Russia); the conditions for the HPLC chromatography: liquid chromatograph with software control and computer analysis of the results of analysis of the brand Shimadzu Prominence C- 20AD with degasser DGU-20A3R and UV-detector Shimadzu SPD-20A; a chromatographic column of Zorbax Eclipse XDB-C18 has measurements 4,6 × 250 mm and a sorbent particle size of 5 μm; mobile phase is a mixture of orthophosphoric acid solution of 0,5% and acetonitrile for chromatography (70: 30); The detection wavelength is 370 nm.

**Results and discussion.** According to literature data, flavonoids of the ginkgo extract are represented by glycosides, derivatives of quercetin, kaempferol and isorhamnetin, and also by condensed through the bond of C<sub>8</sub>-C<sub>3</sub> biflavonoids [15, 19]. The detection of flavonoids was carried out by means of a cyanidin test [16], which allows them to be quickly and reliably identified, both in APS and in the medicinal preparations. The confirmation of the authenticity of the investigated ginkgo MP is also occurred through the presence of characteristic peaks of aglycons of quercetin, kaempferol and isorhamnetin on the HPLC chromatogram (fig. 1). Hydrolysis of flavonoglycosides during the sample preparation was carried out in the presence of hydrochloric acid by heating the reaction mixture for 2 hours in the ethanol medium.

At the stage of development and approbation of the technique of HPLC analysis, the peaks of the analyzed substances on the chromatograms were confirmed by the use of CS solutions of quercetin, kaempferol and isorhamnetin (Sigma Aldrich). Analysis of the obtained experimental data has shown that in order to simplify the procedure for standardizing of the ginkgo substance and drug by HPLC, it is sufficient to use only quercetin CS for the detection of the characteristic peaks on the chromatogram, the detection of which allows us to identify the peaks of kaempferol (the ratio calculated as the  $t_{\text{retention substance}}/t_{\text{retention quercetin}}$  – about 1,9 and  $t_{\text{retention isorhamnetin/quadratin}}$  – about 2,1).



**Figure 1 – Detection of aglycons of flavonoids of the extract of Ginkgo by HPLC.**  
**Legend: 1 – peak of Quercetin; 2 – peak of Kaempferol; 3- peak of Isorhamnetin**

Moreover, the United States Pharmacopeia (USP) considers the control of the ratio of peak areas of flavonoid aglycons for quercetin and kaempferol, which in a benign product should not exceed 2,5:1; This indicator eliminates the introduction of more available substances into the product composition – rutin or quercetin, in order to increase the content of the flavonoid fraction [18].

The content of the sum of flavonoids in the extract and preparations of ginkgo is determined by spectrophotometry and HPLC methods [13, 20]. The HPLC method calls for the summation of areas of peaks of aglycons of quercetin, kaempferol and isorhamnetin on the chromatogram, the received amount is recalculated to the sum of flavonoid glycosides through the peak area CS quercetin and correction factor. The procedure could be reproduced, and it allows the selective assessment of the analyzed class of substances, but depends on the completeness of the hydrolysis of flavonol glycosides; it is laborious in execution and requires considerable time expenditure. In the industrial production of metered MP, in particular of tablets and solutions, the HPLC analysis can significantly affect the speed of interoperational control, namely the tablet mass, tablet cores, intermediate intermediates or solutions. It allows standardizing the analyzed subject only according to the maximum permissible lower level of the quantitative content of the amount of flavonoids. Despite the shortcomings, the technique has a significant advantage in the ability of simultaneous determination of the authenticity and quality of the substance.

The quantitative determination of the sum of flavonoids in the extract and ginkgo preparations was simultaneously tested by use of the direct and differential spectrophotometry. The difference of these approaches lies in the preparation of samples. In the direct spectrophotometry, the optical density is measured in a solution of a substance or a sum of substances in their original structure that has not been altered during any reaction, and the measurement is made with respect to a solvent, usually colorless and

transparent. In the variant of the differential spectrophotometry, the determination is made on the products of the chemical transformations of the analyzed substance or the sum of the substances, the measurement here is relative to the solution prepared analogously to the test, but without the addition of a reagent, complexion agent, oxidizer, etc. In the first variant of direct spectrophotometry, the sum of the analyzed substances was selected in accordance with the selective extraction that contains mainly a fraction of flavonoids, in the second variant – colored complexes of flavonoids with aluminum chloride.

The spectra of UV absorption of the test solutions from the extract of ginkgo and its dosage forms under direct spectrophotometric conditions have a so-called “shoulder” or weakly expressed maximum in the region (340 – 375) nm; The spectra of UV absorption of test solutions under differential spectrophotometry conditions have peaks in the range from 405 to 415 nm (table 1). During the tests, we found out that the dependence of the optical density values of the test solutions on the sample of the extract of ginkgo corresponds to the validation criterion of linearity, which makes it possible to consider both versions of the techniques to be suitable for standardizing of ginkgo preparations.

As a standard sample, both methods used CS routine (Sigma Aldrich), which had absorption maxima at the wavelengths  $(362 \pm 5)$  nm and  $(410 \pm 5)$  nm, respectively (table 1). Solutions of CS routine, in both, direct and in differential spectrophotometry, demonstrate the reproducibility of the optical density, which served as the basis for calculating of the values of the specific absorption index ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) routine under the analysis conditions (table 1). According to the data of table 1, the relative error in determining the specific absorption index for all variants does not exceed 2%, which allows the use of the specified values in the analysis techniques. As it is known, the use of an accurately established indicator allows significantly reducing the duration of the analysis, reducing of

the magnitude and probability of determination error, as well as standardizing in the absence or shortage of CS

rutine, which is important for the current interoperational control in production.

**Table 1 – Comparative characteristics of variants quantitative determination the sum of flavonoids in dry Ginkgo extract by SP-metry**

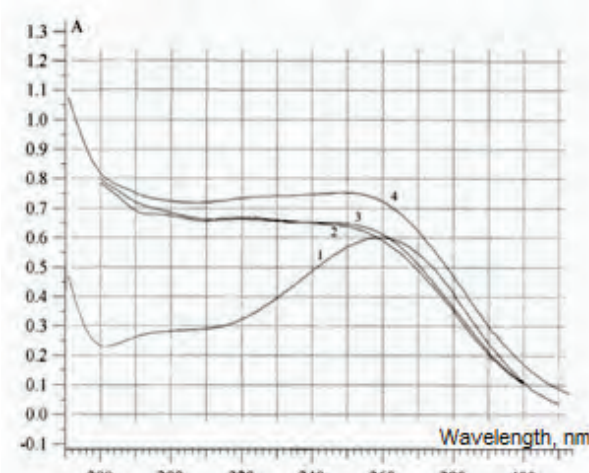
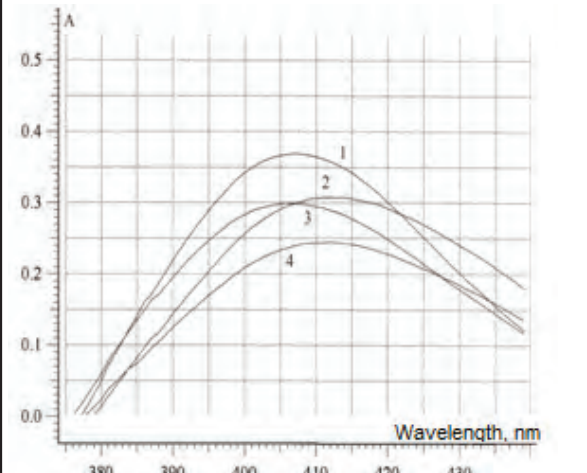
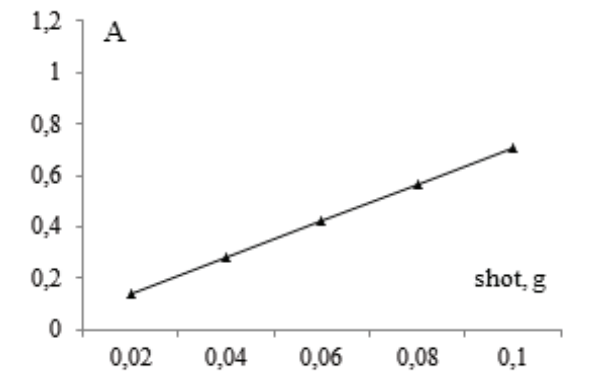
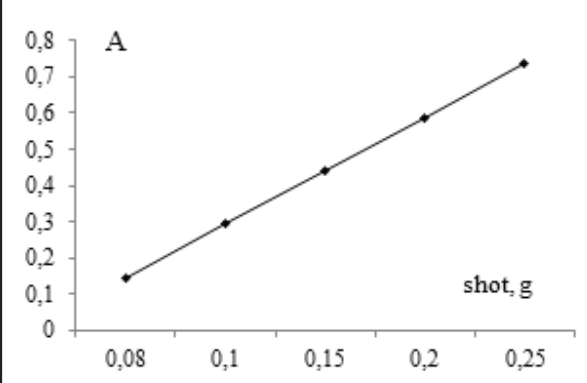
| Spectrophotometry                                                                                                                                                                                                                                                                                       |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------|--------|------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|------|--------|------------|-------------------|
| Direct method                                                                                                                                                                                                                                                                                           |   |      |        |            |                   | Differential method                                                                                                                                                                                                                     |   |      |        |            |                   |
| 1. UV-absorption spectrums of examinees of solutions, according to techniques of determination of the sum of flavonoids in extract and drugs Ginkgo                                                                                                                                                     |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
|                                                                                                                                                                                                                        |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                       |   |      |        |            |                   |
| <p>Legend: 1 – test solution of Rutine (CRS); 2 – test solution from “GINKGO, solution”;<br/>3 – test solution from “GINKGOtablets”; 4 – test solution from the substance «Ginkgo extract dry»</p>                                                                                                      |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
| 2. Dependence of the optical density on the sample by methods of determining the sum of flavonoids Ginkgo extract                                                                                                                                                                                       |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
|                                                                                                                                                                                                                      |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                     |   |      |        |            |                   |
| 3. The values of the specific absorption index ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) rutine                                                                                                                                                                                                                        |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
| $X_{cp.}$                                                                                                                                                                                                                                                                                               | f | P    | S      | $\Delta x$ | $\varepsilon, \%$ | $X_{cp.}$                                                                                                                                                                                                                               | f | P    | S      | $\Delta x$ | $\varepsilon, \%$ |
| 311.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5 | 0.95 | 2.1323 | 5.48       | 1.76              | 186.0                                                                                                                                                                                                                                   | 5 | 0,95 | 1.3969 | 3.59       | 1.93              |
| 4. Methods for determining the amount sum of flavonoids in Ginkgo extract                                                                                                                                                                                                                               |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
| Preparation of test solution A                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
| To 0.1 g (precise shot) of the substance add 30 ml of ethanol 50% and mix with a magnetic stirrer shaker for 5 minutes. The solution is quantitatively measured with an ethanol of 50% transferred to a 50 ml volumetric flask, then the volume is adjusted to the mark with the same ethanol and mixed |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
| Preparation of test solution B                                                                                                                                                                                                                                                                          |   |      |        |            |                   |                                                                                                                                                                                                                                         |   |      |        |            |                   |
| 2.0 ml of solution A is placed in a 50 ml volumetric flask, 0.5 ml of acetic acid is added to a solution of 1%, adjusted to 70 with an ethanol, and mixed                                                                                                                                               |   |      |        |            |                   | 1.0 ml of solution A is placed in a 25 ml volumetric flask, 2 ml of aluminum (III) chloride ethanol solution is added 2%, 0.5 ml of acetic acid is diluted with 30%, then the volume is adjusted with ethanol 70% to the mark and mixed |   |      |        |            |                   |

Table 1 continued

| <i>The spectrophotometric conditions of the test solution B</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| At a wavelength of 362 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | At a wavelength of 410 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm                               |
| <i>Comparison solution</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                    |
| Solution of ethanol 70%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | A solution prepared similarly to solution B, but without adding solution aluminum(III) chloride 2% |
| <p><i>The formula for calculating the content of the amount of flavonoids in the substance</i><br/> <i>In terms of Rutine and dry matter (X) as a percentage:</i></p> $X = \frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot a \cdot 2 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{311,6 \cdot a \cdot (100 - W)},$ $X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot 125000}{186 \cdot a \cdot (100 - W)},$ <p>where A – optical density of the test solution B;<br/> <math>A_{1\text{cm}}^{1\%}</math> – specific indicator of absorption of Rutine in the conditions of analysis;<br/> a – a shot of substance, g;<br/> W – loss in weight drying, %</p> |                                                                                                    |

The most important feature of the extract of ginkgo is the possible presence in its composition of the so-called ginkgolic acids, therefore, the technology of its industrial production provides liquid-liquid extraction with n-heptane or with other suitable extractant for the purpose of their removal. The potential side effect of ginkgolic acids determines the need to monitor their residual content in the substance in order to ensure the safety of MP.

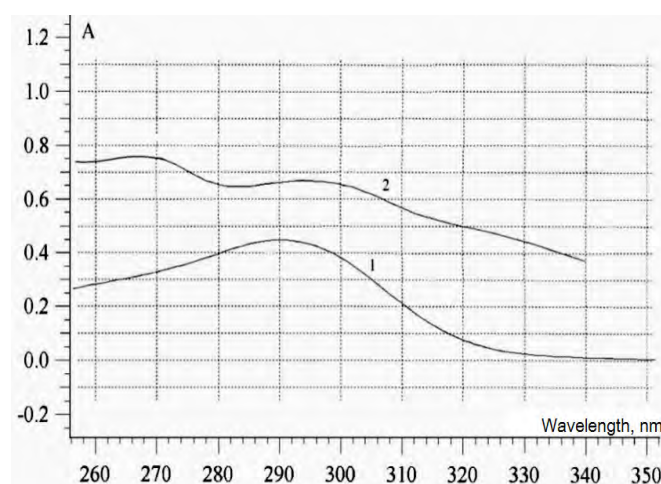
By their properties and chemical structure ginkgoic acids are low-polar 6-alkyl derivatives of salicylic acid (fig. 4).

In the analysis of MP containing ginkgo extract, the minor changes were made to the procedures during the phase of the sample preparation, concerning the need for correction of the sample and additional filtration of solution A. The results of the numerous studies confirmed the possibility of applying the spectrophotometry method in two variations for the quantitative determination of the sum of flavonoids, because in all tests the relative determination error did not exceed 2% (table 4).

Similarly, methods were developed for the spectro-

photometric determination of the sum of terpenolactones and the sum of ginkgoic acids for the purpose of quantitative assessment.

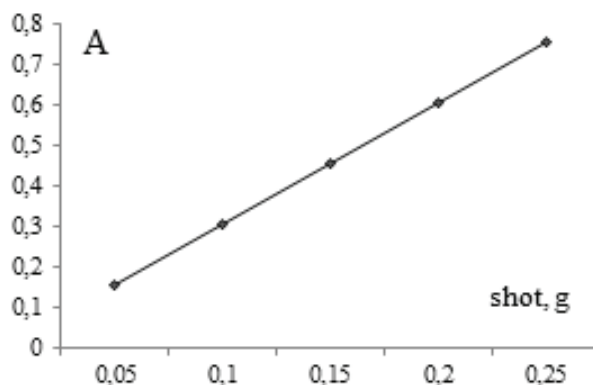
Terpenolactones of ginkgo are represented by sequi- and diterpene derivatives. This group of BAC is characterized by the absence of pronounced absorption bands, which establish the basis for the development of their quantitative determination by differential spectrophotometry by reaction with an oxidizing reagent, in analogy with the previously described [21]. The sample preparation involves the selective isolation from an extract of the ginkgo of the terpenoid fraction by a nonpolar chlorinated organic solvent. Bibobalide (Bilobalide from Ginkgo biloba leaves, Sigma Aldrich) was used as the standard sample, which in the presence of concentrated sulfuric acid forms a compound with a pronounced absorption maximum at a wavelength of  $(292 \pm 5)$  nm. The total UV spectrum of oxidation products of terpenolactones of the extract of ginkgo under the analysis conditions showed absorption maxima at  $(267 \pm 5)$  nm and  $(295 \pm 5)$  nm (fig. 2)



**Figure 2 – UV absorption spectra of oxidation products of Bilobalide (1) and the sum of terpenolactones Ginkgo extract (2) with sulfuric acid concentrated**

The dependence of the optical density of the test solutions on the sample weight of the extract of ginkgo is linear (fig. 3), which is a reliable criterion for the application of this approach.

When developing the technique, the specific absorption index of bilobalide was calculated under the analysis conditions. The results of the statistical method are presented in table. 3.



**Figure 3 – Dependence of the optical density of the test solution on the sample Ginkgo extract in the quantitative determination of the amount of terpenolactones**

As can be seen from the data in Table 3, the relative error of the determination does not exceed 3%, which makes it possible to use the calculated index in the standardization of the extract.

The method of quantitative determination of the sum of terpenolactones in dry ginkgo extract by UV spectrophotometry is presented in table 4. It was tested on samples of dry extract of ginkgo produced by CJSC

«VIFITEH». The assay was performed in six replicates; the results were processed by a statistical method. It was found that the content of the amount of terpenolactones in the extract of ginkgo, determined by the spectrophotometric method, allows to normalize this index at the level of “not less than 6,0%”, since the relative error does not exceed 3,0%, which corresponds to the previously established international requirements (table 6) [18, 20].

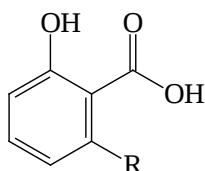
**Table 2 – Method for quantitative determination of the amount of terpenolactones in Ginkgo extract**

| <i>Preparation of test solution A</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| To 0.2 g (precise shot) of the substance is added 40 ml of chloroform and stirred for 30 minutes in a water bath under reflux at a temperature of (60-70) ° C. The mixture is then filtered with 2.0 g of sodium sulfate anhydrous into a 250 ml distillation flask. The conical flask and filter are quantitatively washed with chloroform 2 times in 15 ml portions. Chloroform extraction is evaporated on a rotary evaporator under vacuum at a temperature of (50-60) ° C until the organic solvent is completely removed. The residue is dissolved in 5 ml of chloroform under gentle heating in a water bath and transferred to a 10 ml volumetric flask. The distillation flask was quantitatively washed with the same solvent twice in 2 ml portions. The volume of the solution in a volumetric flask is adjusted with chloroform to a mark and mixed |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>Preparation of test solution B</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 5.0 ml of solution A are placed in a 50 ml flask and are rotary evaporated in vacuum at a temperature of (50-60) ° C until the organic solvent is completely removed. The residue is mixed with 5 ml of sulfuric acid concentrated, which is then transferred to a 10 ml volumetric flask, the flask is rinsed with 3 ml of acid, which is added to the bulk volume in a volumetric flask. The volume of the solution is adjusted to a mark with concentrated sulfuric acid and mixed                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>The spectrophotometric conditions of the test solution B –</i><br>At a wavelength of 295 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>Comparison solution – sulfuric acid concentrated</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <i>The formula for calculating the amount of terpenolactone in the substance in terms of Bilobalide and dry matter (X) as a percentage:</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| $X = \frac{A \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - W)},$                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| where                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <p>A – optical density of the test solution B;</p> <p><math>A_{1\text{cm}}^{1\%}</math> – specific indicator of absorption of Bilobalide in the conditions of analysis;</p> <p>a – a shot of substance, g;</p> <p>W – loss in weight drying, %</p> |

The most important feature of the extract of ginkgo is the possible presence in its composition of the so-called ginkgolic acids, therefore, the technology of its industrial production provides liquid-liquid extraction with n-heptane or with other suitable extractant for the purpose of

their removal. The potential side effect of ginkgoic acids determines the need to monitor their residual content in the substance in order to ensure the safety of MP.

By their properties and chemical structure ginkgoic acids are low-polar 6-alkyl derivatives of salicylic acid (fig. 4).

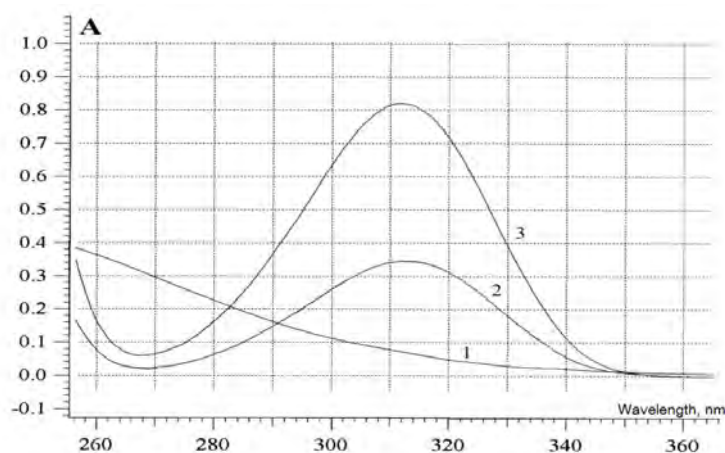


$R = -C_{13}H_{27}$  – Ginkgoic acid GA C 13:0 (6-tridecylsalicylic acid),  
 $R = -C_{15}H_{29}$  – Ginkgoic acid GA C 15:1 (anicardic acid, 6-pentadecenylsalicylic acid),  
 $R = -C_{15}H_{31}$  – Ginkgoic acid GA C 15:0 (6-pentadecylsalicylic acid),  
 $R = -C_{17}H_{31}$  – Ginkgoic acid GA C 17:1 (6-heptadecenyl salicylic acid)

**Figure 4 – Ginkgolic acids identified in leaves of *Ginkgo biloba***

During the development of the test procedure, their physicochemical properties were taken into account (table 3). Extracting agent for the fraction to be analyzed for processing of the sample of dry extract of ginkgo during the sample preparation was *n*-heptane, which eliminates the interfering effect of both the concomitant polar compounds and terpenolactones that are insoluble in this extracting. For a standard sample, we used 6-tridecyl-salicylic acid (*Ginkgolic acid (GA) C 13: 0, Sigma Aldrich*). A solution of GA C 13:0 has a pronounced absorption

maximum at a wavelength ( $311 \pm 2$ ), which we accepted to be analytical in the spectrophotometric determination technique (fig. 5). The sample of the substance to be analyzed is selected so that, if there is a residual amount of ginkgoic acid more than 10 ppm (0.001%), the optical density of the test solution will exceed 0.167, and the UV spectrum will contain a so-called “shoulder” or maximum. In samples of the extract that have been tested, the content of the sum of ginkgolic acids corresponds to the established norm (fig. 5).



**Figure 5 – UV-absorption spectra of the test solution of the extract of *Ginkgo* and solutions of Ginkgoic acid**

**Legend:** 1 – test solution of ginkgo extract; 2 – solution of Ginkgoic acid GA C 13:0 0.520 mg/ml; 3 – solution of Ginkgoic acid GA C 13:0 0.208 mg/ml

**Table 3 – Test procedure for dry *Ginkgo* extract for residual content the sum of Ginkgolic acids**

| Preparation of test solution                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 15.000 g of a substance powder previously dried for 5 hours is placed in a 250 ml conical flask, about 100 ml of <i>n</i> -heptane is added and mixed on a magnetic stirrer for 30 minutes. The mixture is filtered with 2 g of sodium sulfate anhydrous into a 250 ml distillation flask. The conical flask and filter are washed with 20 ml of <i>n</i> -heptane, which are attached to the basic solution. The filtrate is evaporated on a rotary evaporator at a temperature of (75-85) °C until the organic solvent is completely removed. The residue is mixed with 5 ml of <i>n</i> -heptane, then quantitatively with the same solvent is transferred to a 10 ml volumetric flask. The volume of the solution in a volumetric flask is made up to <i>n</i> -heptane to the mark, mixed and filtered |
| The spectrophotometric conditions of the test solution –                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| At a wavelength of 311 nm in a basin with a layer thickness of 10 mm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Comparison solution- <i>n</i> -heptane                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Regulation:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| The optical density of the test solution should not be more than 0.167 (the content of the sum of ginkgolic acid sin terms of Ginkgolic acid C13: 0 – not more than 0.001%)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

The experimental data obtained in the laboratory of the CJSC «VIFITEH» confirmed the effectiveness of applying the spectrophotometry method for estimating the

residual content of the sum of ginkgolic acids in a substance normalized to the upper limit. The relative error of the tests performed does not exceed 2,0%.

During the approbation in the conditions of pharmaceutical production, it was found that the developed methods for the indicators of authenticity, the ratio of quercetin and kaempferol, the test for the content of the amount of ginkgoic acids, the quantitative determination of the sum of flavonoids (ginkgo flavonoglucosides) and the sum of terpenolactones were included in the ND on the substance "Ginkgo biloba extract dry" (CJSC «VIFITEH») and are mandatory for its standardization. With regard to dosage forms, containing

standardized extract of ginkgo, it is advisable to limit the content of flavonoids in the analysis according to the indicator "Quantitative determination", since this indicator is sufficiently informative, characterized by accuracy, reproducibility and ease of execution, which is very important for control of intermediates. Additionally, this parameter is significantly less influenced by the auxiliary components which make up the MP. The results of approbation of the methods are presented in table 4, 5, 6.

**Table 4 – Results of approbation of techniques for standardization of the substance «Ginkgo biloba dry extract» (CJSC «VIFITEH»)**

| Quality index                                                                    |                                | Result of test of substance                                                                                                                                               |                             |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                                                                  |                                | Model 1 (ser. 011216)                                                                                                                                                     | Model 2 (ser. 021216)       |
| High-quality reaction to flavonoids                                              |                                | Positive                                                                                                                                                                  | Positive                    |
| Detection in a hydrolysate of aglycone of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin |                                | Pass the test – on the HPLC chromatogram of the test solutions there are peaks corresponding to the retention time of the peaks of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin |                             |
| Ratio of Quercetin an Kaempferol                                                 |                                | 1.31                                                                                                                                                                      | 1.22                        |
| The content of the amount sum of flavonoids, %                                   | Direct spectrophotometry       | 29.64 ± 0.36<br>(ε = 1.21%)                                                                                                                                               | 28.88±0.54<br>(ε = 1.87%)   |
|                                                                                  | Differential spectrophotometry | 21.78 ± 0.41<br>(ε = 1.88%)                                                                                                                                               | 20.98±0.24<br>(ε = 1.14%)   |
| The content of the amount sum of terpenolactones, %                              |                                | 7.87 ± 0.17<br>(ε = 2.16 %)                                                                                                                                               | 8.03 ± 0.22<br>(ε = 2.74 %) |
| The test for the residual content of the sum of Ginkgoic acids, %                |                                | With stands the test                                                                                                                                                      | With stands the test        |

**Table 5 – Results of approbation of standardization procedures for tablets with Ginkgo extract**

| Quality index                                                                    |                                | Result of test of tablets                                                                                                                                                 |                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                  |                                | «GINKGO, tablets 40 mg»<br>(CJSC «VIFITEH»),<br>Russia                                                                                                                    | «MEMOPLANT,<br>tablets 40 mg»<br>(«Dr. WillimarSchwabe<br>GmbH & Co. KG»), Germany |
| High-quality reaction to flavonoids                                              |                                | Positive                                                                                                                                                                  | Positive                                                                           |
| Detection in a hydrolysate of aglycone of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin |                                | Pass the test – on the HPLC chromatogram of the test solutions there are peaks corresponding to the retention time of the peaks of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin |                                                                                    |
| Ratio of Quercetin and Kaempferol                                                |                                | 0.21                                                                                                                                                                      | 1.3                                                                                |
| The content of the amount sum of flavonoids, mg/tab.                             | Direct spectrophotometry       | 9.84±0.15<br>(ε=1.56%)                                                                                                                                                    | 8.6±0.11<br>(ε=1.34%)                                                              |
|                                                                                  | Differential spectrophotometry | 7.33±1.13<br>(ε=1.76%)                                                                                                                                                    | 6.84±0.13<br>(ε=1.85%)                                                             |

Table 6 – Results of approbation of standardization techniques for solutions with Ginkgo extract

| Quality index                                                                    |                       | Result of test of solution                                                                                                                                             |                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                  |                       | «GINKGO, solution 40 mg/ml»<br>(CJSC «VIFITEH»), Russia                                                                                                                | «TANAKAN®», solution 40 mg/ml»<br>(«Beaufour Ipsen Industrie»), France |
| Ratio of Quercetin and Kaempferol                                                |                       | Positive                                                                                                                                                               | Positive                                                               |
| Detection in a hydrolysate of aglycone of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin |                       | Pass the test – on the HPLC chromatogram of the test solutions there are peaks corresponding the retention time of the peaks of Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin |                                                                        |
| Ratio of Quercetin and Kaempferol                                                |                       | 1.31                                                                                                                                                                   | 1.37                                                                   |
| The content of the amount sum of flavonoids, mg/ml                               | Direct SF-metry       | 10.07 ± 0.1<br>(ε = 1.03 %)                                                                                                                                            | 9.63 ± 0.11<br>(ε = 1.17 %)                                            |
|                                                                                  | Differential SF-metry | 8.30 ± 0.13<br>(ε = 1.57 %)                                                                                                                                            | 7.81 ± 0.11<br>(ε = 1.44 %)                                            |

**Conclusion.** The methods of spectrophotometric determination of the total content of sum of flavonoids, terpenolactones and ginkgoic acids, normalized by standardization of a pharmacologically active substance of plant origin – “Ginkgo biloba extract dry”, the technology of which was reproduced by the pharmaceutical company CJSC “VIFITEH” (Russia) are proposed. All methods are designed taking into account the physical and chemical properties of the identified classes of BAC, meet modern requirements, and are adapted to the conditions of industrial production and quality control. The effectiveness of the HPLC method was confirmed for the

simultaneous identification and evaluation of the benignity of Ginkgo extract and preparations. A comparative evaluation of the spectrophotometric determination of the sum of flavonoids was carried out in the different variants, which are characterized by precision and reproducibility combined with ease of execution. The methods were tested in the control and analytical laboratory of the CJSC “VIFITEH”, the results were validated according to the main criteria that showed the possibility of their use for the control between operation of intermediates and for standardization of the substance, “GINKGO, 40 mg coated tablets” and “GINKGO, solution for enteral use, 40 mg/ml”.

#### Библиографический список

1. Государственный реестр лекарственных средств РФ. URL: [grls.rosminzdrav.ru](http://grls.rosminzdrav.ru) (дата обращения: 04.04.2017).
2. Tan M.S., Yu J.T., Tan C.C., Wanq H.F., Menq X.F., Wanq C., Jiang T., Zhu X.C., Tan L. EFFICACY AND ADVERSE EFFECTS OF GINKGO BILOBA FOR COGNITIVE IMPAIRMENT AND DEMENTIA: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS // *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43(2). P. 589-603. DOI: 10.3233/JAD-140837
3. Онбыш Т.Е., Макарова Л.М., Погорелый В.Е. МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ГИНКГО БИЛОБА // *Современные наукоемкие технологии.* 2005. №5. С. 22–25. URL: <https://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=22912> (дата обращения: 04.04.2017).
4. Корчагина Д.В., Куркина А.В., Дубищев А.В., Кочнева О.Н., Гусев Д.О. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО // *Фундаментальные исследования.* 2013. № 10-4. С. 812-815. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32407> (дата обращения: 04.04.2017).
5. Ковров Г.В., Палатов С.Ю., Лебедев М.А., Мачулина А.И. ИНСОМНИЯ И КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ // *Эффективная фармакотерапия.* 2014. № 31. С. 28-33.
6. Куркин В.А., Петрухина И.К. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ИМПОРТОЗАМЕЩАЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ // *Фундаментальные исследования.* 2014. № 11. С. 366-371. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35529> (дата обращения: 04.04.2017).
7. Эллер К.И., Балусова А.С., Комарова Е.Л. ОЦЕНКА ПОДЛИННОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, КАК СЫРЬЯ ДЛЯ БАД GINKGO BILOBA – ГИНКГО БИЛОБА // *Рынок БАД.* 2005. №4. С.29-30.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации: в 3 т. XIII изд. М., 2015. URL: <http://www.femb.ru/feml> (дата обращения: 14.03.2017).
9. Sasakia K., Wada K., Haga M. CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF GINKGO BILOBA // *Studies in Natural Products Chemistry.* Vol. 28. Part I. 2003. P. 165-198. DOI: 10.1016/S1572-5995(03)80141-2
10. Шкляев С.А., Підпружников Ю.В. Верифікація методики кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів в лікарському засобі, що містить екстракт Гінкго Білоба // *Управління, економіка та забезпечення якості.* 2012. №. 3. С. 4-8.
11. Sloley B.D., Tawfik S.R., Scherban K.A., Tam Y.K. QUALITY CONTROL ANALYSES FOR GINKGO EXTRACTS REQUIRE ANALYSIS OF INTACT FLAVONOL GLYCOSIDES // *J. Food Drug Anal.* 2003. Vol.11. No. 2. P. 102–107.
12. Дайронас Ж.В., Корочинский А.В., Зилфикаров И.Н. МИКРОСКОПИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО И ТРАВЫ ЛАБАЗНИКА ВЯЗОЛИСТНОГО В ТАБЛЕТКАХ «ГИНКГОТРОПИЛ» // *Фармация и фармакология.* 2016. Т.4. №1. С. 36-45. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-1(14)-36-45

13. Куркина А.В., Калабухова Е.А., Власова Г.И., Демидова Г.А., Авдеева Е.В. ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 4. С. 352. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10016> (дата обращения: 04.04.2017).
14. Beek T.A. CHEMICAL ANALYSIS OF GINKGO BILOBA LEAVES AND EXTRACTS // *Journal of Chromatography*. 2002. Vol. 967. Is.1. P. 21-55. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00172-3
15. Гинкго билоба (Ginkgo biloba L.) (Аналитический обзор). URL: <http://www.npkfarm.ru/dlya-spetsialistov/ginkgo-biloba-ginkgo-biloba-l-analiticheskiy-obzor.html> (дата обращения 15.04.2017).
16. Куркина А.В., Загоскина Н.В., Рязанова Т.К. СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ GINKGO BILOBA (GINKGOACEAE), КУЛЬТИВИРУЕМОГО В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ РОССИИ // *Растительные ресурсы*. 2013. Т. 49. № 3. С. 410-415.
17. Fuzzati N., Pace R., Villa F. A SIMPLE HPLC-UV METHOD FOR THE ASSAY OF GINKGOLIC ACIDS IN GINKGO BILOBA EXTRACTS // *Fitoterapia*. 2003. №74. P.247–256. DOI: 10.1016/S0367-326X(03)00040-6
18. United States Pharmacopeia. 31-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008.
19. Куркин В.А., Буланкин Д.Г., Даева Е.Д., Каденцев В.И. ФЛАВОНОИДЫ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО (GINKGO BILOBA L.) // *Химия растительного сырья*. 2012. №2. С. 85-88.
20. European Pharmacopoeia 7.0. 04/2008. P. 1531-1534.
21. Орлова С.Е., Зилфикаров И.Н., Алиев А.М. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПИРТОВОГО И УГЛЕКИСЛОТНОГО ЭКСТРАКТОВ ПАЛЬМЫ САБАЛЯ // *Химия растительного сырья*. 2012. №4. С. 137-142.

#### References

1. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv RF [State register of medicines of the Russian Federation]. URL: [grls.rosminzdrav.ru](http://grls.rosminzdrav.ru) (access data 04.04.2017) (In Russ.)
2. Tan M.S., Yu J.T., Tan C.C., Wanq H.F., Menq X.F., Wanq C., Jiang T., Zhu X.C., Tan L. EFFICACY AND ADVERSE EFFECTS OF GINKGO BILOBA FOR COGNITIVE IMPAIRMENT AND DEMENTIA: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43(2). P. 589-603. DOI: 10.3233/JAD-140837
3. Onbysh T.E., Makarova L.M., Pogorely V.E. MEKHAIZMY REALIZACII FARMAKOLOGICHESKOJ AKTIVNOSTI EKSTRAKTA GINKGO BILOBA [MECHANISMS FOR THE REALIZATION OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THE GINKGO BILOBA EXTRACT]. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii [Modern science-intensive technologies]*. 2005. No 5. P. 22-25. URL: <https://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=22912> (access data: 04.04.2017). (In Russ.)
4. Korchagin D.V., Kurkina A.V., Dubishchev A.V., Kochneva ON, Gusev D.O. IZUCHENIE NEJROTROPNOJ AKTIVNOSTI LEKARSTVENNYH PREPARATOV NA OSNOVE LISTEV GINKGO DVULOPISTNOGO [STUDY OF NEUROTROPIC ACTIVITY OF DRUGS BASED ON GINKGO LEAVES OF BILOBATE]. *Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental research]*. 2013. No. 10-4. P. 812-815. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=32407> (access data: 04.04.2017). (In Russ.)
5. Kovrov G.V., Palatov S.Y., Lebedev M.A., Machulina A.I. INSOMNIYA I KOGNITIVNYE NARUSHENIYA [INSOMNIA AND COGNITIVE IMPAIRMENT]. *Effektivnaya farmakoterapiya [Effective pharmacotherapy]*. 2014. No 31. P. 28-33. (In Russ.)
6. Kurkin V.A., Petrukhin I.K. AKTUALNYE ASPEKTY SOZDANIYA IMPORTOZAMESHCHAYUSHCHIH LEKARSTVENNYH RASTITELNYH PREPARATOV [ACTUAL ASPECTS OF THE CREATION OF IMPORT-SUBSTITUTING HERBAL MEDICINES]. *Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental research]*. 2014. No. 11. P. 366-371. URL: <https://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35529> (access data: 04.04.2017) (In Russ.)
7. Eller K.I., Balusova A.S., Komarova E.L. OCENKA PODLINNOSTI RASTITELNYH EKSTRAKTOV KAK SYRYA DLYA BAD GINKGO BILOBA GINKGO BILOBA [EVALUATION OF AUTHENTICITY OF VEG-ETABLE EXTRACTS, AS RAW MATERIALS FOR BAD. GINKGO BILOBA – GINKGO BILOBA]. *Rynok BAD [Market BAD]*. 2005. No. 4. P.29-30. (In Russ.)
8. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii v 3 t XIII izd [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: 3 vol. XIII ed]. Moskva [Moscow], 2015. URL: <http://www.femb.ru/feml> (access data: 14.03.2017). (In Russ.)
9. Sasakia K., Wada K., Haga M. CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF GINKGO BILOBA // *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 28. Part I. 2003. P. 165-198. DOI: 10.1016/S1572-5995(03)80141-2
10. Shklyayev S.A., Pidpruzhnikov Y.V. VERIFIKACIYA METODIKI KILKISNOGO VIZNACHENNYA GINKGO-FLAVONOGL KOZIDIV V LIKARSKOMU ZASOBI SHCHO MISTIT EKSTRAKT GINKGO BILOBA [VERIFICATION OF THE METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF GINKGO-FLAVONOGLYCOSIDIV IN A DRUG CONTAINING THE EXTRACT OF GINKGO BILOBA]. *Upravlinnya ekonomika ta zabezpechennyyakosti [Management, Economics and Provision of Liquidity]*. 2012. No. 3. P. 4-8 (In Ukr.)
11. Sloley B.D., Tawfik S.R., Scherban K.A., Tam Y.K. QUALITY CONTROL ANALYSES FOR GINKGO EXTRACTS REQUIRE ANALYSIS OF INTACT FLAVONOL GLYCOSIDES. *J. Food Drug Anal.* 2003. Vol.11. No. 2. P. 102–107.
12. Daironas Zh.V., Korochinsky A.V., Zilfikarov I.N. MICROSCOPY OF THE DIAGNOSTIC ELEMENTS OF THE LEAVES OF GINKGO BILOBATE AND GRASS OF THE MEADOWSWEED IN THE TABLETS “GINKGOTROPIL”. *Pharmacy & Pharmacology*. 2016. Vol. 4. No. 1. P. 36-45.

13. Kurkina A.V., Kalabukhova E.A., Vlasova G.I., Demidova G.A., Avdeev E.V. OBOSNOVANIE NOVYH PODHODOV K STANDARTIZACII LISTEV GINKGO DVULOPASTNOGO S POMOSHCHYU METODA VEZH-KH [SUBSTANTIATION OF NEW APPROACHES TO THE STANDARDIZATION OF GINKGO BILOBATE LEAVES USING THE HPLC METHOD]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2013. No. 4. P. 352. (In Russ.)
14. Beek T.A. CHEMICAL ANALYSIS OF GINKGO BILOBA LEAVES AND EXTRACTS. *Journal of Chromatography*. 2002. Vol. 967. Is.1. P. 21-55. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00172-3
15. Ginkgo biloba (Ginkgo biloba L.). Analiticheskij obzor [Ginkgo biloba (Ginkgo biloba L.) (Analytical review)]. URL: <http://www.npkfarm.ru/dlya-spetsialistov/ginkgo-biloba-ginkgo-biloba-l-analiticheskiy-obzor.html> (access data: 15/05/2017). (In Russ.)
16. Kurkina A.V., Zagorskina N.V., Ryanskova T.K. SOSTAV I SODERZHANIE FLAVONOIDOV V LISTYAH GINKGO BILOBA GINKGOACEAE KULTIVIRUEMOGO V RAZLICHNYH REGIONAH ROSSII [COMPOSITION AND CONTENT OF FLAVONOIDS IN THE LEAVES OF GINKGO BILOBA (GINKGOACEAE), CULTIVATED IN VARIOUS REGIONS OF RUSSIA]. *Rastitelnye resursy* [Vegetable resources]. 2013. Vol. 49. No. 3. P. 410-415. (In Russ.)
17. Fuzzati N., Pace R., Villa F. A SIMPLE HPLC-UV METHOD FOR THE ASSAY OF GINKGOLIC ACIDS IN GINKGO BILOBA EXTRACTS. *Fitoterapia*. 2003. №74. P.247–256. DOI: 10.1016/S0367-326X(03)00040-6
18. United States Pharmacopeia. 31-th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention. Inc., 2008.
19. Kurkin V.A., Bulankin D.G., Daeva E.D., Kadentsev V.I. FLAVONOIDY LISTEV GINKGO DVULOPASTNOGO GINKGO BILOBA L [FLAVONOIDS FROM THE LEAVES OF GINKGO BILOBA (GINKGO BILOBA L.)]. *Himiya rastitelnogo syrya* [Chemistry of plant raw materials]. 2012. No. 2. P. 85-88. (In Russ.)
20. European Pharmacopoeia 7.0 04/2008: 1827. P. 1531-1534
21. Orlova S.E., Zilfikarov I.N., Aliev A.M. SRAVNITELNOE FITOHIMICHESKOE ISSLEDOVANIE SPIRTOVOGO I UGLEKISLOTNOGO EKSTRAKTOV PALMY SABALYA [COMPARATIVE PHYTOCHEMICAL STUDY OF ALCOHOL AND CARBON DIOXIDE EXTRACTS OF THE PALM OF THE CABAL]. *Himiya rastitelnogo syrya* [Chemistry of plant raw materials]. 2012. No. 4. P. 137-142. (In Russ.)

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Авторы:**

**Марченко Мария Алексеевна** – инженер-химик лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ». Область научных интересов: фармакогностическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья, разработка фитопрепаратов. ORCID: [orcid.org/0000-0002-0689-2260](http://orcid.org/0000-0002-0689-2260) E-mail: [marchenko.mariya2018@yandex.ru](mailto:marchenko.mariya2018@yandex.ru)

**Зилфикаров Ифрат Назимович** – доктор фармацевтических наук, профессор РАН. Главный научный сотрудник отдела фитохимии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений». Начальник лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ». Область научных интересов: разработка, технология и стандартизация лекарственных растительных препаратов. ORCID: [orcid.org/0000-0002-8638-9963](http://orcid.org/0000-0002-8638-9963) E-mail: [dagfarm@mail.ru](mailto:dagfarm@mail.ru)

**Ибрагимов Тимур Алгасанович** – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры аналитической и фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет». Преподаватель кафедры фармации ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет». Область научных интересов: разработка методов стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. E-mail: [aloefarm@mail.ru](mailto:aloefarm@mail.ru)

**Малеев Алексей Геннадиевич** – инженер-хроматографист лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ». Область научных интересов: фармакогностическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья, разработка фитопрепаратов, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: [alexx007\\_10@mail.ru](mailto:alexx007_10@mail.ru)

**Authors:**

**Marchenko Mariya Alexeevna** – chemical engineer of the laboratory of the QCD CJSC “VIFITEH”. Research interests: farmakognosy studying and standardization of medicinal plants, development of medicine from a plant. ORCID: [orcid.org/0000-0002-0689-2260](http://orcid.org/0000-0002-0689-2260) E-mail: [marchenko.mariya2018@yandex.ru](mailto:marchenko.mariya2018@yandex.ru)

**Zilfikarov Ifrat Nazimovich** – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor RAS. Chief researcher at the Department of Phytochemistry FSBSI “All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants”. Chief laboratory QCD of CJSC “VIFITEH”. Research interests: development, technology and standardization of medicinal herbal preparations. ORCID: [orcid.org/0000-0002-8638-9963](http://orcid.org/0000-0002-8638-9963) E-mail: [dagfarm@mail.ru](mailto:dagfarm@mail.ru)

**Ibragimov Timur Algasanovich** – Candidate of Sciences (Pharmacy), Associate Professor of the Department of Analytical Chemistry and Pharmaceutical FSBGEI “Dagestan State University.” Teacher of the Department of Pharmacy FGBGEI “Dagestan State Medical University”. Research interests: development of methods for standardization of medicinal plant raw materials and preparations based on it. E-mail: [aloefarm@mail.ru](mailto:aloefarm@mail.ru)

**Maleev Aleksey Gennadievich** – engineer chromatographer laboratory QCD CJSC “VIFITEH”. Research interests: farmakognosy studying and standardization of medicinal herbs, phytopharmaceuticals development, high performance liquid chromatography. E-mail: [alexx007\\_10@mail.ru](mailto:alexx007_10@mail.ru)

Поступила в редакцию: 22.04.2017

Принята к печати : 15.05.2017

Received: 22.04.2017

Accepted for publication: 15.05.2017

УДК 615.012/.014

## ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА С ДЕТОКСИКАЦИОННЫМ ЭФФЕКТОМ

Т.В. Попова<sup>1,2</sup>, Н.О. Карабинцева<sup>1</sup>, Л.Н. Рачковская<sup>2</sup>, Т.Г. Толстикова<sup>3</sup>,  
А.А. Котлярова<sup>1,2</sup>, А.Ю. Лetyагин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Новосибирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной  
лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного  
учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии  
и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»,  
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения  
Российской академии наук, 630090, Россия, г. Новосибирск,  
просп. Академика Лаврентьева, 9

Современные технологии и уровень фундаментальных исследований позволяют создавать медицинские сорбенты с заранее определенными структурными, прочностными и адсорбционными свойствами. Сорбционные материалы интересны не только в роли детоксикантов, используемых для удаления токсических агентов из жидких сред, но и в качестве носителей для доставки в зоны терапевтического воздействия биологически активных веществ. **Целью работы** является обоснование состава полифункционального препарата с антибактериальным и детоксикационным эффектами за счет комплекса серебра и сорбционной составляющей – алюмо-кремний содержащего сорбента. **Материалы и методы.** В работе использовали физико-химические (сорбционная активность красителя метиленового синего, удельная поверхность, водородный показатель при контакте с водой, атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой) и фармацевтические методы (насыпная плотность, растворение для твердых дозированных лекарственных форм исследования). **Результаты и обсуждение.** Обоснован двухстадийный способ иммобилизации комплекса серебра и гидрофобизатора на поверхность сорбционной матрицы. Выделен образец оптимального состава серебросодержащего препарата: оксид – гидроксид алюминия – 99,2%, кластерное серебро (Арговит – С 2%) – 0,3% в расчете на серебро и вспомогательное вещество (гидрофобизатор – ПМС марка П – 841) – 0,5%. Выход серебра в раствор из образца указанного состава за 8 часов не превышал  $1,6 \pm 0,3\%$ , величина удельной поверхности –  $90 \text{ м}^2/\text{г}$ , величина водородного показателя –  $8,1 \pm 0,02$ , насыпная плотность –  $1,12 \pm 0,11 \text{ г/см}^3$ . **Заключение.** В работе экспериментально обоснован состав серебросодержащего препарата  $\text{AlSi/Ag}$ , получены комплексные научные данные о его физико-химических, технологических особенностях.

**Ключевые слова:** серебро, сорбенты, иммобилизация

### Для цитирования:

Попова Т.В., Карабинцева Н.О., Рачковская Л.Н.,  
Толстикова Т.Г., Котлярова А.А., Лetyагин А.Ю.  
«ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ  
ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО  
СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА  
С ДЕТОКСИКАЦИОННЫМ ЭФФЕКТОМ».  
Фармация и фармакология. 2017;5(3):243-253.  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-243-253

© Попова Т.В., Карабинцева Н.О.,  
Рачковская Л.Н., Толстикова Т.Г.,  
Котлярова А.А., Лetyагин А.Ю., 2017

### For citation:

Popova T.V., Karabinceva N.O.,  
Rachkovskaya L.N., Tolstikova T.G.,  
Kotlyarova A.A., Letyagin A.Yu.  
“THE POSSIBILITY OF CREATING  
MULTIFUNCTIONAL SILVER-  
CONTAINING DRUGS WITH  
DETOXIFYING EFFECT”.  
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):243-253. (In Russ.)  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-243-253

## THE POSSIBILITY OF CREATING MULTIFUNCTIONAL SILVER-CONTAINING DRUGS WITH DETOXIFYING EFFECT

**T.V. Popova<sup>1,2</sup>, N.O. Karabinceva<sup>1</sup>, L.N. Rachkovskaya<sup>2</sup>, T.G. Tolstikova<sup>3</sup>,  
A.A. Kotlyarova<sup>1,2</sup>, A.Yu. Letyagin<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> NOVOSIBSMU «Novosibirsk State Medical University», 52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091, Russia.

E-mail: [argentum.popova@mail.ru](mailto:argentum.popova@mail.ru)

<sup>2</sup> NIIKEL – branch of the Institute of Ecology and Natural Resources of the SB RAS «Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute

of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences», 2, Timakov Street, Novosibirsk, 630060, Russia. E-mail: [argentum.popova@mail.ru](mailto:argentum.popova@mail.ru);

<sup>3</sup> NIOCH SB RAS «N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry Of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences», 9, Akademik Lavrentyev Prospekt, Novosibirsk, 630090, Russia. E-mail: [tg\\_tolstikova@mail.ru](mailto:tg_tolstikova@mail.ru)

Modern technology and the level of fundamental studies allow us to create the medical sorbents with the predetermined structural, mechanical and adsorptional properties. Sorption materials are interesting not only as detoxicants that are used to remove toxic agents from the liquid media, but also as carriers for a delivery in zones a therapeutic effect of biologically active substances. **The aim** of this work is the substantiation of structure of the multifunctional drug with anti-bacterial and detoxifying effects due to the complex of silver and the sorption component – alumina-silica-containing sorbent. **Materials and methods.** We used physico-chemical (sorption activity of methylene blue dye, specific surface, pH in contact with water, atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma) and pharmaceutical methods (bulk density, dissolution test for solid dosage forms). **Results and discussion.** The two-stage method of immobilization of a complex of silver and water repellent on the surface sorption matrix was justified. The sample of the optimum composition of silver-containing drugs was selected: aluminium oxide-hydroxide – 99.2%, clustered silver (Argovit – C – 2%) – 0.3 %, based on silver and subsidiary substance (repellents – brand PMS P – 841) – 0.5 %. The output of silver into the solution from the specified sample composition for 8 hours did not exceed  $1.6 \pm 0.3\%$ , the value of specific surface area of  $90 \text{ m}^2/\text{g}$ , the value of pH to  $8.1 \pm 0.02$ , bulk density  $1.12 \pm 0.11 \text{ g/cm}^3$ . **Conclusion.** An experimentally substantiated composition of silver-containing drug AlSi/Ag was received, a comprehensive scientific data of its physico-chemical and technological properties were obtained.

**Keywords:** silver, sorbents, immobilization

**Введение.** В настоящее время препараты, обладающие сорбционными свойствами, устойчиво занимают свою нишу в медицинской и фармацевтической отраслях. Современные технологии и уровень фундаментальных исследований, прежде всего, в области твердого тела, позволяют создать медицинские сорбенты с заранее определенными структурными, прочностными и адсорбционными свойствами [1-4].

Новые подходы в разработке технологий получения сорбентов позволили получить конкурентоспособные сорбционные материалы для медицины: угольные энтеросорбенты (СКН, СУГС, КАУ, ФАС, СКТ-6А, ИГИ, ВНИИТУ); углеволокнистые сорбенты, углеродминеральный сорбент (СУМС-1), сорбенты на основе лигнина (Полифепан), сорбент на основе кремнийорганического полимера (Энтеросгель) и др. [5].

Сорбционные материалы интересны не только в роли детоксикантов, используемых для удаления токсических агентов из жидких сред, но и в качестве носителей для доставки в зоны терапевтического воздействия биологически активных веществ (БАВ) (антибиотики, антисептики, цитостатики, фермен-

ты). Для этого сорбент предварительно насыщают необходимыми препаратами, а затем применяют в режиме сорбции-десорбции [5]. Сорбент при этом обеспечивает возможность носителя БАВ при сохранении функций детоксиканта. Так, установлена положительная экспериментальная и клиническая эффективность полифункциональных средств, созданных на основе сорбента, с иммобилизованными на его поверхности метронидазолом, липооризином, антибиотиком [6].

Большой интерес в этом плане представляют препараты серебра, не вызывающие побочных реакций и обладающие широким антибактериальным спектром действия, что позволило бы применять препараты серебра для лечения острых кишечных инфекций [7]. Основная проблема в лечении острых кишечных инфекций заключается в трудности выявления возбудителя и, как следствие, выборе адекватной фармакотерапии, в основе которой лежат принципы применения антибактериальных (в основном антибиотиков) препаратов и сорбционных средств. Зачастую, в связи с неустановленной этиологией возбудителя, лечение антибиотиками не имеет положительного результата,

в связи с чем возобновляется интерес к препаратам серебра, в том числе и серебросодержащим сорбентам [8–12]. На сегодняшний день в реестре ЛС РФ отсутствуют зарегистрированные серебросодержащие препараты для внутреннего применения [13]. При этом в качестве биологически активной добавки зарегистрирована отечественная серебросодержащая композиция для внутреннего применения «Арговит-С» [7, 8, 14].

**Целью работы** является обоснование состава и технологии получения полифункционального препарата с антибактериальным и детоксикационным эффектами за счет комплекса серебра и сорбционной составляющей – алюминий-, кремнийсодержащего сорбента (AlSi/Ag).

**Материалы и методы.** В качестве сорбционной матрицы использовали термоактивированный гидроксид алюминия мелкодисперсный, далее называемый оксид-гидроксид алюминия (марка АОК 63-92, ТУ 6-68-141-98). Для формирования гидрофильно гидрофобной природы поверхности сорбционной матрицы использовали вспомогательные вещества (ВВ) – полиметилсилоксановые водные эмульсии (ПМС): КЭ – 10 – 01 (содержания кремния 25-28%), П – 841 (содержание кремния 25,5 %), П- 814 (содержание кремния 20,6%) (ГОСТ 13032-77). Для придания препарату антибактериальных свойств использовали кластерное серебро – «Арговит-С» с содержанием 2% серебра (ТУ 9310-003-79044259-12).

Используемый в работе серебросодержащий препарат «AlSi/Ag» был приготовлен с содержанием серебра 0,3%, что не превышает эквивалентные высшую разовую дозу (содержание серебра 0,019 г) и высшую суточную дозу (содержание серебра 0,063 г), описанного в литературе фармакопейного препарата азотнокислого серебра, ранее применяемого *per os* [15].

Определение величины удельной поверхности ( $S_{\text{БЭТ}}$ ) образцов проводили на приборе ASAP-2400 Micromeritics методом низкотемпературной (77 К) сорбции паров азота на образцах (классический метод Брунауэра – Эммета – Теллера (БЭТ)) в предположении мономолекулярного слоя молекул азота на поверхности и известной площади поперечного сечения молекулы адсорбированного газа. Используя экспериментальные данные по адсорбции, строили изотермы сорбции, по которым определяли величину удельной поверхности. Перед проведением экспериментов образцы тренировали в вакууме  $10^{-4}$  мм. рт. ст. при температуре до  $100^{\circ}\text{C}$  в течение 5 часов [4].

Оценку насыпной плотности проводили на приборе марки ПНО.00.00.ПС. согласно ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» [16].

Величину водородного показателя pH определяли на приборе pH – 410 «НПКФ Аквилон» путем периодического перемешивания в течение 30 минут

точной навески образца (1 г) с водой очищенной в соотношении 1:20, фиксируя температуру раствора [4].

Сорбционную ёмкость по отношению к красителю метиленовому синему (молек. масса – 320 г/моль, исходная концентрация – 1,5 мг/мл) определяли с помощью спектрофотометра марки Cary 60 “Hekatech”, согласно ОФС 1.2.1.0002.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» [16].

Содержание серебра в твердом образце и в растворе определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) ОФС.1.2.1.1.0004.15 «Атомно-эмиссионная спектрофотометрия» [16] на спектрометре модели «IRIS Advantage» фирмы «Jarrell Ash.» (США) с возбуждением спектра пробы в аргоновой плазме, которая создается под действием высокочастотного электромагнитного поля, с программным обеспечением «ITEVA» в комплекте с автосамплером для автоматической подачи проб со спектральным диапазоном измерений от 170 до 800 нм и относительным средним квадратическим отклонением выходного сигнала (при концентрации, превышающей более чем в 1000 раз предел обнаружения) не более 1%. Серебро определяли по аналитической линии 328.068 нм.

Необходимость измерения содержания серебра в растворе связана с количественным определением высвобождающегося («выхода») серебра с поверхности сорбента в тесте «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Тест «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» проводили в соответствии с методиками ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» на приборе типа «Вращающаяся корзинка2» [16]. Величина навески серебросодержащего препарата на сорбционной основе 3,5 г. В качестве среды для растворения использовали 500 мл воды очищенной с температурой  $37^{\circ}\text{C}$  при скорости вращения 100 оборотов в минуту. Аликвоты объемом 1 мл отбирали через 0 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, и 8 часов от начала эксперимента. Для поддержания постоянного объема в стакан добавляли равный объем воды очищенной. Содержание серебра в растворе (и в твердых образцах) определяли спектрофотометрически (АЭС-ИСП) [16].

**Результаты и обсуждение.** Выбор сорбционной матрицы оксида-гидроксида алюминия обоснован размером частиц (0,04 мкм), объемом пор (0,2 см<sup>3</sup>/г), величиной удельной поверхности (100 м<sup>2</sup>), насыпным весом (0,98–1,23 г/см<sup>3</sup>) и наличием мезо-, макропористой структуры. Небольшой размер частиц сорбционной матрицы обуславливает высокую геометрическую поверхность, которая, наряду с особенностями пористой структуры, приводит к увеличению скорости сорбции извлекаемых компонентов

различной природы и молекулярной массы. Химическая природа поверхности оксида-гидроксида характеризуется наличием гидрофильных центров гидроксильных групп.

Следует отметить, что традиционно используемые гидрофобные угольные сорбенты (размер частиц 0,5–2 мм) для энтерального применения специально подвергаются окислению кислородсодержащими газами для формирования пористой структуры и гидрофобно-гидрофильной химической природы поверхности с целью увеличения сорбционной активности в отношении сорбции токсических агентов разной природы. В известном углеродминеральном сорбенте, наоборот, поверхность оксида алюминия (размер частиц 0,4–1 мм) модифицируют углеродом с формированием гидрофильно – гидрофобной химической природы поверхности [4].

Выше приведенные подходы к формированию поверхности и характеристики оксида – гидроксида алюминия свидетельствуют о перспективности применения выбранного материала для создания препарата для энтерального применения [17, 18, 19].

Для обеспечения тропности разрабатываемого препарата к сорбатам (токсины) различной природы, гидрофильную поверхность оксида-гидроксида алюминия модифицировали гидрофобным ВВ – ПМС.

Выбор и обоснование используемых ПМС (гидрофобизаторов) марки П-841 и П – 814 и КЭ 10 – 01 основывается на проведенных ранее исследованиях по оценке размера частиц водных эмульсий в диапазонах температур от 20 до 60°C с интервалом 5,0°C и

временем выдержки 4 минуты (при каждой температуре производили по 10 измерений). Было показано, что с увеличением температуры гидродинамический диаметр частиц эмульсии уменьшается. По данным мономодального анализа при температурах 55–60°C средний эффективный диаметр составил 217–231 нм. С помощью полимодального анализа (использовался алгоритм *NNLS – non-negatively constrained least squares*) установлено, что в растворе находились две фракции частиц с диаметрами 88 нм и 578 нм. Эти размеры сопоставимы с размерами мезо- и макропор исходной матрицы, что предполагает сохранность и доступность всех взаимосвязанных между собой пор в модифицированном носителе – сорбенте и перспективности разработанной методики для дальнейшего исследования [20]. Также от выбора ВВ зависит и прочность связывания серебра с поверхностью матрицы.

Для обеспечения более прочного закрепления серебра на поверхности оксида – гидроксида алюминия была реализована двухстадийная технология, заключающаяся в последовательной иммобилизации комплекса серебра и дальнейшего «замуровывания» его ВВ. Технология иммобилизации антибактериального компонента в конечном счете определяет безопасность применения серебросодержащего препарата.

По результатам предварительных исследований для дальнейшего углубленного изучения были выбраны несколько составов экспериментального серебросодержащего препарата AlSi/Ag (табл.1).

**Таблица 1 – Состав экспериментальных серебросодержащих препаратов AlSi/Ag (на 100 г)**

| Состав                                                                                                                  | Экспериментальные образцы  |     |     |      |     |     |      |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|
|                                                                                                                         | A1                         | A2  | A3  | A4   | A5  | A6  | A7   | A8  | A9  |
| Матрица, %                                                                                                              | 99,2                       |     |     | 98,7 |     |     | 97,7 |     |     |
| Арговит-С, %                                                                                                            | 0,3 (в расчете на серебро) |     |     |      |     |     |      |     |     |
| П – 814, %                                                                                                              | 0,5                        |     |     | 1,0  |     |     | 2,0  |     |     |
| П – 841, %                                                                                                              |                            | 0,5 |     |      | 1,0 |     |      | 2,0 |     |
| КЭ – 10–01, %                                                                                                           |                            |     | 0,5 |      |     | 1,0 |      |     | 2,0 |
| Примечание: матрица – оксид-гидроксид алюминия; Арговит-С – серебросодержащий компонент; А 1-А 9 – синтез в две стадии. |                            |     |     |      |     |     |      |     |     |

Образцы были получены с повышением концентрации ВВ каждой марки ПМС с целью увеличения липофильной кроющей поверхности и образования активных центров «закрепления» серебра, что существенно влияет на сорбционную активность и «высвобождение» ионов серебра.

В ходе подготовительных работ у экспериментальных образцов А4, А7 и А8 была выявлена абсолютная несмачиваемость водой. Частицы агломерировались в крупные «кластеры» и находились преимущественно на поверхности раствора, что по-

служило причиной их исключения из дальнейших исследований.

Для выявления оптимального состава серебросодержащего препарата были определены два наиболее важных показателя: количественное определение массовой доли серебра после предполагаемого высвобождения («выхода») с поверхности носителя в тесте «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (табл. 2) и сорбционная активность по отношению к красителю метиленовому синему (рис. 1).

Таблица 2 – Результаты теста «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» для экспериментальных образцов серебросодержащего препарата AlSi/Ag

| № эксп. | Образец | Растворение, % |           |           |           |           |
|---------|---------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|         |         | 0              | 0,5 часа  | 1 час     | 2 часа    | 8 часов   |
| 1       | A1      | 0,02 ± 0,4     | 3,9 ± 0,2 | 4,5 ± 0,8 | 4,9 ± 0,6 | 4,7 ± 0,5 |
| 2       | A2      | 0,03 ± 0,1     | 1,3 ± 0,2 | 3,0 ± 0,6 | 1,3 ± 0,2 | 1,6 ± 0,3 |
| 3       | A3      | 0,01 ± 0,2     | 2,8 ± 0,2 | 4,7 ± 0,8 | 2,7 ± 0,8 | 4,7 ± 0,5 |
| 4       | A5      | 0,04 ± 0,1     | 1,4 ± 0,1 | 3,4 ± 0,7 | 2,5 ± 0,2 | 1,6 ± 0,1 |
| 5       | A6      | 0,01 ± 0,2     | 2,0 ± 0,2 | 2,7 ± 0,8 | 3,7 ± 0,8 | 4,7 ± 0,5 |
| 6       | A9      | 0,02 ± 0,1     | 2,7 ± 0,1 | 4,7 ± 0,1 | 3,7 ± 0,2 | 6,3 ± 0,5 |

При исследовании высвобождения серебра с поверхности сорбционной матрицы суммарные значения показателя для образцов A1, A2, A3, A5, A6 и A9 при контакте с водой за 8 часов составили 18%, 7,2%, 14,9%, 8,9%, 13,1% и 17,4% соответственно от количества иммобилизованного. Эти

данные в 32 раза (и более) меньше токсической дозы серебра (0,06 г), что свидетельствует о безопасности применения разработанной формы при энтеральном применении серебросодержащего препарата, как антибактериального агента с широким спектром действия.

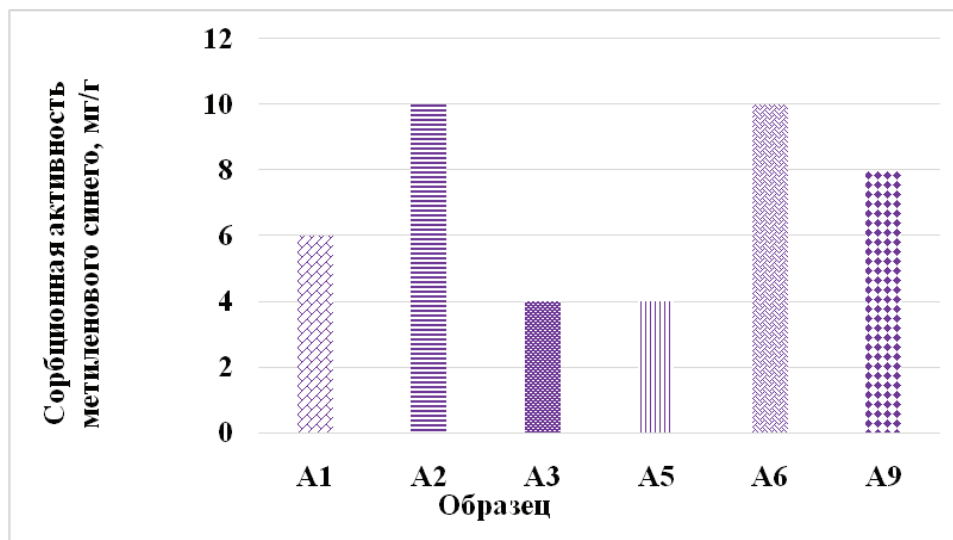


Рисунок 1 – Сорбционная активность метиленового синего образцов A1, A2, A3, A5, A6 и A9.

Исследование сорбционной активности, относительно маркера среднемолекулярных токсинов позволило выделить два образца – A2 и A6 с наибольшим показателем. Последующие исследования насыпной плотности, величины удельной поверхности и водородного показателя при контакте с водой наиболее перспективных образцов показали, что при одинаковой насыпной плотности образцов, сопоставимых величин водородного показателя и сорбционной активности показатель удельной поверхности образца A2 выше аналогичного показателя

образца A6 в 1,5 раза (табл 3). Это обстоятельство, очевидно, связано с меньшим количеством использованного полимера (0,5%), в образце же A6 содержание полимера 1% (табл.3). Более низкое содержание ПМС в образце A2 способствует равномерному распределению полимера на поверхности матрицы и, благодаря этому, сохранению высокой величины удельной поверхности и доступности активных центров, что делает образец A2 наиболее оптимальным для создания энтерального средства с детоксикационным эффектом.

Таблица 3 – Результаты насыпной плотности, величины удельной поверхности и pH при контакте с водой экспериментальных образцов A2 и A6

| № | Образец | P, г/см <sup>3</sup> | S <sub>уд.</sub> , м <sup>2</sup> /г | pH         |
|---|---------|----------------------|--------------------------------------|------------|
| 1 | A2      | 1,12 ± 0,11          | 90 ± 0,001                           | 8,1 ± 0,02 |
| 2 | A6      | 1,12 ± 0,13          | 60 ± 0,001                           | 6,8 ± 0,02 |

Примечание: P – насыпная плотность, г/см<sup>3</sup>; S<sub>уд.</sub> – величина удельной поверхности, м<sup>2</sup>/г; pH – величина водородного показателя при контакте с водой

Таким образом, в результате исследования был определен оптимальный состав серебросодержащего препарата AlSi/Ag, состоящий из пористой матрицы оксида – гидроксида алюминия (99,2%), кластерного серебра (0,3% в расчете на серебро) и ВВ (гидрофобизатор) – ПМС (марки П – 841 в процентном содержании 0,5%).

**Заключение.** В работе впервые экспериментально обоснован состав полифункционального серебросодержащего препарата AlSi/Ag с детоксикационным эффектом, а также получены комплексные научные данные о его физико-химических, технологических

особенностях. Был выделен образец серебросодержащего препарата AlSi/Ag (A2) оптимального состава: оксид – гидроксид алюминия – 99,2%, кластерного серебра (Арговит – С 2%) – 0,3 % в расчете на серебро и ВВ (гидрофобизатор – ПМС марка П-841) – 0,5% с оптимальными свойствами: выход серебра в раствор за 8 часов не превышал  $0,8 \pm 0,2\%$ , сорбционная активность в отношении маркера среднемoleкулярных токсинов (метиленового синего) –  $10 \pm 0,02$  мг/г, величина удельной поверхности –  $90 \text{ м}^2/\text{г}$ , величина водородного показателя –  $8,1 \pm 0,02$ , насыпная плотность –  $1,12 \pm 0,11 \text{ г/см}^3$ .

**Introduction.** Currently, drugs that have sorption properties, steadily occupy a niche in the medical and pharmaceutical industries. Modern technologies and the level of fundamental research, first of all, in the field of a solid body, make it possible to create medical sorbents with predetermined structural, strength and adsorptional properties [1-4].

The new approaches in the development of technologies for the production of sorbents allowed us to obtain the competitive sorption materials for medicine: carbon enterosorbents (SKN, SUGS, KAU, FAS, SKT-6A, IGI, VNIITU); carbon fiber sorbents, operationally sorbent (SUMS-1), sorbents based on lignin (Polyphepan), sorbent on the basis of silicone polymer (Enterosgel), and others [5].

The sorption materials are interesting not only as detoxicants that are used to remove toxic agents from the liquid media, but also as carriers for a delivery in zones of a therapeutic effect of the biologically active substances (BAS) (antibiotics, antiseptics, cytostatics, enzymes). For this purpose, the sorbent is pre-saturated with the necessary preparations, and then used in the regime of sorption-desorption [5]. The sorbent provides the capability of a carrier of the native biologically active substances, while maintaining the function of a detoxifier. Thus, a positive experimental and clinical efficiency of the multifunctional products based on the sorbent with immobilized on its surface metronidazole, leparisien, antibiotic was determent [6].

A great interest in this direction have the preparations of silver, which do not cause adverse reactions and possess a broad antibacterial spectrum of action, which would allow the use of silver preparations for the treatment of acute intestinal infections [7]. The main problem in the treatment of acute intestinal infections is the difficulty in the identification of a pathogen and, as a consequence, in choice of adequate pharmacotherapy, based on the principles of use of the antibacterial (mainly antibiotic) drugs and sorption materials. Often, because of the unknown etiology of a pathogen, treatment with antibiotics does not have a positive result. In addition, antibiotics do not have an effect on viruses, and therefore interest in silver preparations, including silver-containing

sorbents, is renewed [8-12]. In recent time, there are no registered silver-containing preparations for the internal use in the register of drugs of the Russian Federation [13]. At the same time, a domestic silver-containing composition for internal application “Argovit-C” was registered, as a biologically active additive [7, 8, 14].

**The aim** of this work is the substantiation of structure of the multifunctional drug with anti-bacterial and detoxifying effects due to the complex of silver and the sorption component – alumina-silica-containing sorbent.

**Materials and methods.** Thermoactivated aluminium hydroxide finely dispersed was used as a sorption matrix, hereinafter referred to as aluminum oxide-hydroxide (brand AOC 63-92, TU 6-68-141-98). For the formation of the hydrophilic – hydrophobic nature of the surface of a sorption matrix used excipients – polymethylsiloxane water emulsion (ICP): FE – 10 – 01 (silicon content of 25-28%), P – 841 (silicon content of 25.5 %), P – 814 (silicon content of 20.6 %) (GOST 13032-77). To make the preparation with antibacterial properties used clustered silver “Argovit” with a content of 2% silver (TU 9310-003-79044259-12).

Used in the work the silver-containing preparation “AlSi / Ag” was made with a silver content of 0,3%, that is not exceeding the equivalent of the WFD (the silver content 0,019 g) and IRR (silver content 0,063 g) described in the literature of the Pharmacopoeia preparation of silver nitrate, previously used *per os* [15].

The determination of the specific surface area (BET) of the samples was conducted on the instrument ASAP-2400 Micromeritics by a method of low-temperature (77 K) adsorption of nitrogen vapor on the samples (classic method Brunauer – Emmett – teller (BET), under the assumption of a monomolecular layer of nitrogen molecules on the surface and the known cross-sectional area of adsorbed gas molecules. By using experimental data on the adsorption, built sorption isotherms, which helped to determine the value of specific surface area. Before experiments, the samples were trained in a vacuum of  $10^{-4}$  mmHg at temperature up to  $100^\circ\text{C}$  for 5 hours [4].

An assessment of bulk density was carried out on the appliance of the PNA.00.00.PS. brand, according

to OFS.1.4.2.0016.15 “the Degree of flowability of powders” [16].

The value of pH was determined by pH – 410 “NPKF Aquilon” by the periodic stirring for 30 minutes of the exact weighed portion of a sample (1 g) with purified water at a ratio of 1 : 20, fixing the temperature of the solution [4].

Sorption capacity with respect to the dye methylene blue (mol. weight – 320 g/mol, the initial concentration of 1.5 mg/ml) was determined by using spectrophotometer Cary 60 brand “Hekatech,” according to OFS 1.2.1.0002.15 “Spectrophotometry in the ultraviolet and visible regions” [16].

The silver content in the solid sample and in the solution was determined by the atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (AES-ICP) FFS.1.2.1.1.0004.15 “Atomic emission spectrophotometry” [16], on the spectrometer IRIS Advantage model of the firm Jarrell Ash (United States), with the excitation spectrum of the sample in an argon plasma, which is created under the action of high-frequency electromagnetic field, with the software “ITEVA”, together with autosampler for automatic feed of samples and with the spectral measurement range from 170 to 800 nm and a relative standard deviation of the output signal (at a concentration exceeding more than 1000 times the detection limit) not more than 1 %. Silver was determined by analytical line 328.068 nm.

The need of measurement of the silver content in solution is associated with the quantitative determination of the released (“release”) of silver from the surface of the sorbent in the test “Dissolution test for solid dosage forms”. Test “Dissolution test for solid dosage forms” was carried out in accordance with the methods of the CFC. 1.4.2.0014.15 “Dissolution test for solid dosage forms” was carried out on device of class “Rotating basket” [16]. The size of the sample of silver-containing drug on the basis of sorption was 3.5 G. As a medium for dissolving was used 500 ml of purified water with 37C at a speed of 100 rpm. Aliquots of 1 ml were taken after 0 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, and 8 hours from the start of the experiment. To maintain a constant volume in the beaker, an equal volume of purified water was added. The silver content in the solution (and solids) was determined spectrophotometrically (AES-ICP) [16].

**Results and discussion.** The choice of the sorption matrix of aluminum oxide-hydroxide is justified by the particle size (0.04 mm), the pore volume (0.2 cm<sup>3</sup> / g), the specific surface area (100 m<sup>2</sup>), the bulk density (0.98 – 1.23 g / cm<sup>3</sup>), and by the presence of a meso-, macroporous structure. The small particle size of the sorption matrix causes a high geometric surface, which, along with the characteristics of the porous structure, leads to an increase in the rate of sorption of substances of the different nature and molecular weight. The chemical nature of the oxide-

hydroxide surface is characterized by the presence of hydrophilic centers of the hydroxyl groups.

It should be noted, that traditionally used hydrophobic coal sorbents (particle size 0.5-2 mm) for the enteral use should be specially oxidized with oxygen-containing gases to form a porous structure and hydrophobic-hydrophilic chemical nature of the surface in order to increase the sorption activity of toxic substances of the different nature. In contrast, in a known carbon-mineral sorbent the aluminum oxide surface (particle size 0.4-1 mm) gets modified by carbon to form the hydrophilic-hydrophobic chemical nature of the surface [4].

The above discussed approaches for the formation of the surface and the characteristics of aluminum oxide-hydroxide suggest that the use of the selected material for the development of the drug for enteral use is promising [17, 18, 19].

For providing the affinity of the developed preparation for sorbates (toxins) of various nature, the hydrophilic surface of aluminum oxide-hydroxide was modified with hydrophobic auxiliary substance – PMS.

The choice and justification of the used hydrophobizers of grades P-841 and P-814 and KE 10-01 is based on earlier studies of the particle size of aqueous emulsions in the temperature ranges from 20 to 60 ° C with an interval of 5.0 ° C and a holding time of 4 minutes (At each temperature, 10 measurements were made). It was shown that with the increasing temperature the hydrodynamic diameter of the emulsion particles decreases. According to the monomodal analysis at temperatures of 55-600C, the average effective diameter was 217-231 nm. By using a multimodal analysis (using the NNLS-non-negatively constrained least squares algorithm), it was found that two fractions of particles with diameters of 88 nm and 578 nm were in solution. These dimensions are comparable with the sizes of the meso- and macropores of the original matrix, which implies the preservation and accessibility of all pores interconnected in a modified carrier-sorbent and the prospects of the developed technique for further investigation [20]. The strength of the binding of silver to the surface of the matrix also depends on the choice of the auxiliary substance.

To ensure a more permanent fixation of silver on the surface of aluminum oxide hydroxide, a two-stage manufacturing technology, consisting in the sequential immobilization of the silver complex and its further “fixing” with auxiliary substance (polymethylsiloxane) was executed. The technology of immobilization of the antibacterial component ultimately determines the safety of using a silver-containing drug.

Based on the results of preliminary studies, several compositions of the experimental silver-containing AlSi / Ag preparation were selected for further detailed study (Table 1).

**Table 1 – Compositions of experimental silver-containing preparations AlSi / Ag (100 g)**

| Composition                                                                                                                 | Experimental samples     |     |     |      |     |     |      |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|
|                                                                                                                             | A1                       | A2  | A3  | A4   | A5  | A6  | A7   | A8  | A9  |
| Matrix,%                                                                                                                    | 99.2                     |     |     | 98.7 |     |     | 97.7 |     |     |
| Argovit – C,%                                                                                                               | 0.3 (in terms of silver) |     |     |      |     |     |      |     |     |
| P – – 814,%                                                                                                                 | 0.5                      |     |     | 1.0  |     |     | 2.0  |     |     |
| P – 841,%                                                                                                                   |                          | 0.5 |     |      | 1.0 |     |      | 2.0 |     |
| KE – 10 – 01, %                                                                                                             |                          |     | 0.5 |      |     | 1.0 |      |     | 2.0 |
| Note: the matrix is aluminum oxide-hydroxide; Argovit – C – silver-containing component; A 1-A 9 – synthesis in two stages. |                          |     |     |      |     |     |      |     |     |

Samples were obtained with an increasing concentration of the auxiliary substance of each grade of PMS in order of increasing of the lipophilic coating surface and the formation of active “fixing” centers of silver, which significantly affects the sorption activity and the “release” of silver ions.

In the preparatory work of the experimental samples A4, A7 and A8, absolute water nonwettability was revealed. The particles agglomerated into large “clusters”

and were mainly on the surface of the solution, which was the reason for their exclusion from further research.

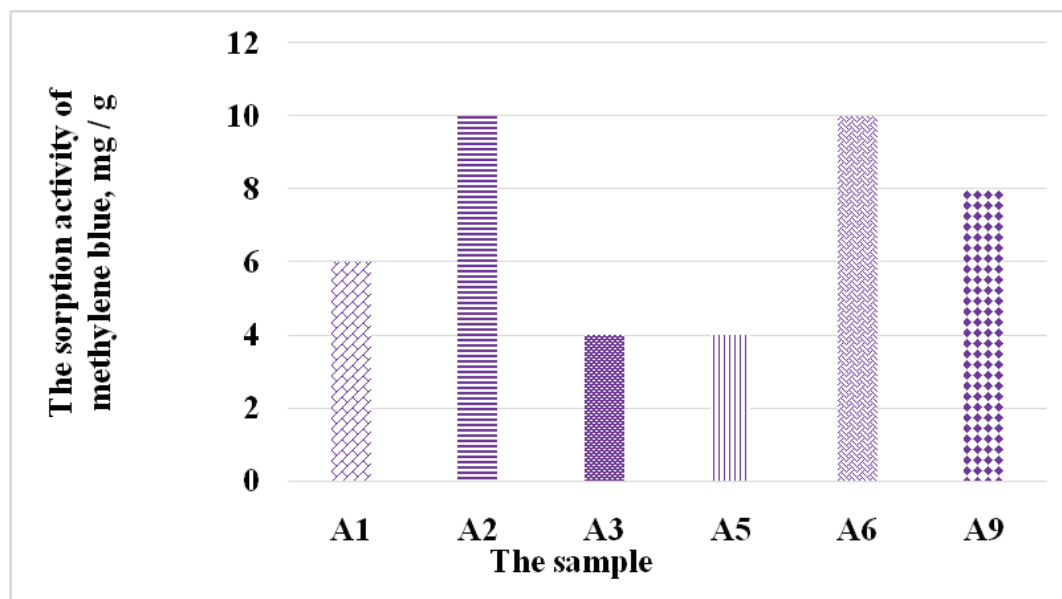
To determine the optimal composition of the silver-containing preparation, two most important indicators were determined: the quantitative determination of the mass fraction of silver after the supposed release from the carrier surface in the “Dissolution test for solid dosage forms” (Table 2) and sorption activity of methylene blue (Figure. 1)

**Table 2 – The results of dissolution test for solid dosage forms for the experimental samples of the silver-containing preparation AlSi / Ag**

| Exp. No | Sample | Dissolution,% |           |           |           |           |
|---------|--------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|         |        | 0             | 0.5 hour  | 1 hour    | 2 hour    | 8 hour    |
| 1       | A1     | 0.02 ± 0.4    | 3.9 ± 0.2 | 4.5 ± 0.8 | 4.9 ± 0.6 | 4.7 ± 0.5 |
| 2       | A2     | 0.03 ± 0.1    | 1.3 ± 0.2 | 3.0 ± 0.6 | 1.3 ± 0.2 | 1.6 ± 0.3 |
| 3       | A3     | 0.01 ± 0.2    | 2.8 ± 0.2 | 4.7 ± 0.8 | 2.7 ± 0.8 | 4.7 ± 0.5 |
| 4       | A5     | 0.04 ± 0.1    | 1.4 ± 0.1 | 3.4 ± 0.7 | 2.5 ± 0.2 | 1.6 ± 0.1 |
| 5       | A6     | 0.01 ± 0.2    | 2.0 ± 0.2 | 2.7 ± 0.8 | 3.7 ± 0.8 | 4.7 ± 0.5 |
| 6       | A9     | 0.02 ± 0.1    | 2.7 ± 0.1 | 4.7 ± 0.1 | 3.7 ± 0.2 | 6.3 ± 0.5 |

In the study of silver release from the surface of the sorption matrix, the total values of the index for samples A1, A2, A3, A5, A6 and A9 in contact with water for 8 hours were 18%, 7.2%, 14.9%, 8.9% 13.1% and 17.4%, from the amount of immobilized,

respectively. These data are 32 times (and more) less than the toxic dose of silver (0.06 g), which indicates the safety of the developed form for the enteric use of a silver-containing drug which is an antibacterial agent with a wide spectrum of action.

**Figure 1 – Sorption activity of methylene blue by samples A1, A2, A3, A5, A6 and A9.**

The study of the sorption activity of the marker of medium molecular toxins made it possible to distinguish two samples marked A2 and A6. These samples have the highest sorption index. Subsequent studies of bulk density, specific surface area, and hydrogen index during the contact with water of the most promising samples showed that for identical bulk density of samples, comparable values of the hydrogen index and sorption activity, the specific surface area of sample A2 is 1.5 times higher than

that of sample A6 (Table 3). This circumstance is obviously connected with a smaller amount of used polymer (0.5%), in turn in the sample A6 polymer content is 1%, (Table 3). The lower content of PMS in the sample A2 promotes a uniform distribution of the polymer on the surface of the matrix, and because of that maintains a high specific surface area and availability of active sites, which makes the A2 sample the most promising for creating an enteric agent with a detoxification effect.

**Table 3 – Results of bulk density, specific surface area and pH in contact with water of experimental samples A2 and A6**

| № | Sample | P, g / cm <sup>3</sup> | S <sub>specific</sub> , m <sup>2</sup> / g | pH         |
|---|--------|------------------------|--------------------------------------------|------------|
| 1 | A2     | 1.12 ± 0.11            | 90 ± 0.001                                 | 8.1 ± 0.02 |
| 2 | A6     | 1.12 ± 0.13            | 60 ± 0.001                                 | 6.8 ± 0.02 |

Note: P – the bulk density, g / cm<sup>3</sup>; S<sub>specific</sub> – the specific surface area, m<sup>2</sup> / g; pH – the value of the hydrogen index in contact with water

Thus, the optimal composition of the silver-containing AlSi / Ag preparation that consists of a porous matrix of aluminum hydroxide-oxide (99.2%), cluster silver (0.3% calculated on silver), and the auxiliary substance (hydrophobizer) -PMS (grade P – 841 in the percentage content of 0.5%) was determined during this study.

**Conclusion.** For the first time, the composition of a multifunctional silver-containing preparation AlSi / Ag with a detoxification effect was experimentally established, and the complex scientific data of its physico-chemical

and technological features were obtained. A sample of the silver-containing preparation AlSi / Ag (A2) of the optimal composition was isolated: aluminum oxide-hydroxide – 99.2%, cluster silver (Argovit -C 2%) 0.3% calculated on silver ions and the auxiliary substance (water repellent-PMS grade P – 841) is 0.5%, with optimal properties: the release of silver in solution within 8 hours did not exceed 0.8 ± 0.2%, the sorption activity of the marker of medium-molecular toxins (methylene blue) is 10 ± 0.02 mg / G, the specific surface area is 90 m<sup>2</sup> / g, the value of the hydrogen index is 8.1 ± 0.02, the bulk density is 1.12 ± 0.11 g / cm<sup>3</sup>.

#### Библиографический список

1. Фенелонов В. Б. Пористый углерод. Новосибирск: изд. ин-та катализа СО РАН, 1995. 518 с.
2. Бородин Ю.И., Коненков В.И., Пармон В.Н., Любарский М.С., Рачковская Л.Н., Бгатов Н.П., Летагин А.Ю. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОРБЕНТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ // *Успехи современной биологии*. 2014. Т. 134, № 3. С. 236-248.
3. Никова М.И., Петрова И.В. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОТ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ // *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: познание*. 2012. № 12 (15). С. 11–14.
4. Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Дарнева И.С., Новоселова Т.И. Энтеросорбент Ноолит. Для физической и психологической реабилитации. Новосибирск: изд. «Сова», 2006. 221 с.
5. Рачковская Л.Н., Летагин А.Ю., Бурмистров В.А., Королев М.А., Гельфонд Н.Е., Бородин Ю.И., Коненков В.И. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2015. Т. 35. № 2. С. 47–54.
6. Белоусова Е.А., Волчкова Е.В., Русанова Е.В., Цодикова О.М. АНТИБИОТИКО-АССОЦИИРОВАННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ КИШЕЧНИКА // *Эффективная фармакотерапия*. 2011. № 8. С. 12–17.
7. Бурмистров В.А., Пестряков А.Н., Олегова Г.В., Бурмистров И.В., Бурмистров А.В., Богданчикова Н.Е. Комплексный препарат для профилактики и лечения кишечных инфекций // Пат. 2519659, Россия; Оpubл. 20.06.2014.
8. Сладков А.В., Игнатова В.А., Полонская А.А., Самедова А.Э. Разработка и внедрение на рынок натурального антибиотика (коллоидное серебро) в условиях вступления в ВТО // *Актуальные проблемы экономического развития: сборник докладов международной заочной научно-практической конференции, посвященной 20-летию Института экономики и менеджмента: сб. науч. тр. / Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова. Белгород, 2013. С. 206–208.*
9. Шуб Г.М., Шаповал О.Г., Вельмакин С.Е., Сакулина Л.Б. ИЗМЕНЕНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ *ESCHERICHIA COLI* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 6–6. С. 1453–1455.
10. Александрова С.С., Атаманов И.В., Садвокасова А.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА

- В КАЧЕСТВЕ АЛЬТЕРНАТИВЫ АНТИБИОТИКАМ В ПТИЦЕВОДСТВЕ // *Вестник государственного аграрного университета Северного Зауралья*. 2016. № 4(35). С.41–46.
11. Bowler P.G., Welsby S., Towers V. IN VITRO ANTIMICROBIAL EFFICACY OF A SILVER-CONTAINING WOUND DRESSING AGAINST MYCOBACTERIA ASSOCIATED WITH ATYPICAL SKIN ULCERS // *Wounds*. 2013. Vol. 25. No. 8. P. 225–230.
  12. Martin N.L., Bass P., Liss S.N. ANTIBACTERIAL PROPERTIES AND MECHANISM OF ACTIVITY OF A NOVEL SILVER-STABILIZED HYDROGEN PEROXIDE // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. No. 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0131345.
  13. Государственный реестр лекарственных средств, 2017. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 22.04.2017).
  14. Блажитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И., Родионов П.П. Серебро в медицине. Новосибирск: Наука-Центр, 2004. 254 с.
  15. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 1. – 14 изд., испр. и доп. М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2002. 354 с.
  16. Государственная фармакопея РФ XIII изд. Т. 1–3. М., 2015. URL: [femb.ru-feml](http://femb.ru-feml) (дата обращения: 22.04.2017).
  17. Воронцов И.И. Способ лечения эрозивного гастрита // Пат. 2183479, Россия; Оpubл. 20.06.2002.
  18. Беляков Н.А. Энтеросорбция. Л.: Центр сорбционных технологий, 1991. 336 с.
  19. Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Letyagin A.Y., Tolstikova T.G., Korolyov M.A., Bogdanchikova N., Pestryakov A.N., Kotlyarova A.A., Burmistrov V., Kononkov V.I. SILVER CONTAINING SORBENTS: PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES // *Resource-Efficient Technologies*. 2016. Vol. 2. Is. 2. P. 43–49. DOI: 10.1016/j.reffit.2016.06.001
  20. Рачковская Л.Н., Гельфонд Н.Е., Губина В.И., Эрымбаева А.Т., Булавченко, Подлипская Т.Ю. Подходы к конструированию сорбентов // *Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: сб. науч. тр. / НИИКЭЛ СО РАМН*. Новосибирск, 2013. С. 269–271.

### References

1. Fenelonov V. B. Poristyj uglerod [Porous carbon]. Novosibirsk: izdatelstvo institutata kataliza SO RAN [Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences], 1995. 518 p. (In Russ.)
2. Borodin Yu.I., Kononkov V.I., Parmon V.N., Lyubarsky M.S., Rachkovskaya L.N., Bgatova N.P., Letyagin A.Yu. BIOLOGICHESKIE SVOJSTVA SORBENTOV I PERSPEKTIVY IH PRIMENENIYA [BIOLOGICAL PROPERTIES OF SORBENTS AND PERSPECTIVES OF THEIR APPLICATION]. *Uspekhi sovremennoj biologii* [Advances in modern biology]. 2014. Vol. 134. N 3. P. 236–248. (In Russ.)
3. Nikova M.I., Petrova I.V. SORBENTY DLYA OCHISTKI BIOLOGICHESKIH ZHIDKOSTEJ OT TYAZHELYH METALLOV [SORBENTS FOR CLEANING BIOLOGICAL FLUIDS FROM HEAVY METALS]. *Sovremennaya nauka aktualnye problemy teorii i praktiki. Seriya: poznanie* [Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice. Series: knowledge]. 2012. N 12 (15). P. 11–14. (In Russ.)
4. Borodin Y.I., Rachkovskaya L.N., Darneva I.S., Novoselova T.I. Enterosorbent Noolit. Dlya fizicheskoy i psichologicheskoy reabilitatsii [Enterosorbent Noolite. For physical and psychological rehabilitation]. Novosibirsk izdatelstvo «Sova» [Novosibirsk: “The Owl”], 2006. 221 p. (In Russ.)
5. Rachkovskaya L.N., Letyagin A.Yu., Burmistrov V.A., Korolev M.A., Gelfond N.E., Borodin Y.I., Kononkov V.I. MODIFITSIROVANNYE SORBENTY DLYA PRAKTICHESKOGO ZDRAVOOHRANENIYA [MODIFIED SORBENTS FOR PRACTICAL PUBLIC HEALTH]. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* [Siberian Scientific Medical Journal]. 2015. T.35, N 2. С 47 – 54. (In Russ.)
6. Belousova E.A., Volchkova E.V., Rusanova E.V., Tsodikova O.M. ANTIBIOTIKO-ASSOCIIROVANNYE PORAZHENIYA KISHECHNIKA [ANTIBIOTIC-ASSOCIATED INTESTINAL LESIONS]. *Effektivnaya farmakoterapiya* [Effective pharmacotherapy]. 2011. N 8. P. 12–17. (In Russ.)
7. Burmistrov V.A. (RU), Pestryakov A.N. (RU), Olegova G.V. (RU), Burmistrov I.V. (RU), Burmistrov A.V. (RU), Bogdanchikova N.E. (MX). Kompleksnyj preparat dlya profilaktiki i lecheniya kishechnykh infekcij [Complex preparation for the prevention and treatment of intestinal infections]. Pat. 2519659, Russia. Publ. 06/20/2014. (In Russ.)
8. Sladkov A.V., Ignatova V.A., Polonskaya A.A., Samedova A.E. Razrabotka i vnedrenie na rynek naturalnogo antibiotika kolloidnoe srebro v usloviyah vstupleniya v vto [Development and introduction of a natural antibiotic (colloidal silver) to the market in the context of accession to the WTO]. / Aktualnye problemy ekonomicheskogo razvitiya sbornik dokladov mezhdunarodnoj zaochnoy nauchno-prakticheskoy konferencii posvyashchennoj 20-letiyu instituta ekonomiki i menedzhmenta sb nauch tr [Actual problems of economic development: a collection of reports of an international correspondence scientific-practical conference on the 20th anniversary of the Institute of Economics and Management: coll. Sci. Tr.] Belgorodskij gosudarstvennyj tekhnologicheskij universitet im V G Shuhova Belgorod [Belgorod State Technological University. V.G. Shukhova]. Belgorod, 2013. P. 206–208. (In Russ.)

9. Shub G.M., Shapoval O.G., Velmakin S.E., Sakulina L.B. IZMENENIE ADGEZIVNOJ AKTIVNOSTI ESCHERICHIA COLI I PSEUDOMONAS AERUGINOSA POD VLIYANIEM NANOCHASTIC SEREBRA [CHANGE IN THE ADHESIVE ACTIVITY OF ESCHERICHIA COLI AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA UNDER THE INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES]. *Fundamentalnye issledovaniya* [Fundamental research]. 2013. N 6 -6. P. 1453-1455. (In Russ.)
10. Alexandrova S.V., Atamanov I.V., Sadvokasova A.A. ISPOLZOVANIE KOLLOIDNOGO SEREBRA V KACHESTVE ALTERNATIVY ANTIBIOTIKAM V PTICEVODSTVE [USE OF COLLOIDAL SILVER AS AN ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS IN POULTRY FARMING]. *Vestnik gosudarstvennogo agrarnogo universiteta Severnogo Zauralya* [Bulletin of the State Agrarian University of the Northern Zauralye]. 2016. N 4 (35). P.41-46. (In Russ.)
11. Bowler P.G., Welsby S., Towers V. IN VITRO ANTIMICROBIAL EFFICACY OF A SILVER-CONTAINING WOUND DRESSING AGAINST MYCOBACTERIA ASSOCIATED WITH ATYPICAL SKIN ULCERS. *Wounds*. 2013. Vol. 25. No. 8. P. 225–230.
12. Martin N.L., Bass P., Liss S.N. ANTIBACTERIAL PROPERTIES AND MECHANISM OF ACTIVITY OF A NOVEL SILVER-STABILIZED HYDROGEN PEROXIDE. *PLoS One*. 2015. Vol. 10. No. 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0131345.
13. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv [The State Register of Medicinal Products], 2017. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/>. (Date access data: 22.04.2017). (In Russ.)
14. Blagitko E.M., Burmistrov V.A., Kolesnikov A.P., Mikhailov Yu. I., Rodionov P.P. Serebro v medicine [Silver in medicine]. Novosibirsk: Nauka – Centr [Novosibirsk: Science – Center], 2004. 254 c. (In Russ.)
15. Mashkovsky M.D. Lekarstvennye sredstva [Medicines]. T. 1. – 14 ed., Rev. And additional. Moskva: «Izdatelstvo Novaya Volna» [Moscow: Open Company “Publishing house the New Wave”], 2002. 354 p. (In Russ.)
16. Gosudarstvennaya farmakopeya RF, XIII izd [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII ed.] T. 1-3. Moskva [Moscow], 2015. URL: <http://femb.ru-feml>. (In Russ.)
17. Vorontsov I.I. Sposob lecheniya erozivnogo gastrita [Method of treatment of erosive gastritis]. Pat. 2183479, Russia; Publ. 20.06.2002. (In Russ.)
18. Belyakov N.A. Enterosorbciya [Enterosorption]. Leningrad: Centr sorbciionnyh tekhnologij [Leningrad: Sorption Technologies Center], 1991. 328 p. (In Russ.)
19. Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Letyagin A.Y., Tolstikova T.G., Korolyov M.A., Bogdanchikova N., Pestryakov A.N., Kotlyarova A.A., Burmistrov V., Konenkov V.I. SILVER CONTAINING SORBENTS: PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES. *Resource-Efficient Technologies*. 2016. Vol. 2. Is. 2. P. 43–49. DOI: 10.1016/j.refit.2016.06.001
20. Rachkovskaya L.N., Gelfond N.E., Gubina V.I., Erimbaeva A.T., Bulavchenko, Podlipskaya T.U. Podhody k konstruirovaniyu sorbentov [Approaches to the design of sorbents]. *Fundamentalnye problemy limfologii i kletочноj biologii sb nauch tr* [Fundamental problems of lymphology and cell biology: Sat. Sci. Tr.] NIKEL SO RAMN [NIKEL SB RAMS]. Novosibirsk, 2013. P. 269 – 271. (In Russ.)

---

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

---

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

---

#### Авторы:

**Попова Татьяна Викторовна** – преподаватель кафедры фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО НГМУ; младший научный сотрудник лаборатории лимфорегуляции НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Область научных интересов: фармацевтическая технология и технология создания сорбционных композиций. ORCID. ORG/0000-0003-0812-4799 E-mail: [argentum.popova@mail.ru](mailto:argentum.popova@mail.ru).

**Карабинцева Наталия Олеговна** – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО НГМУ. Область научных интересов: фармацевтическая технология. E-mail: [karnatol@yandex.ru](mailto:karnatol@yandex.ru).

#### Autors:

**Popova Tatyana Viktorovna** – a lecturer of the Department of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Novosibirsk State Medical University; the scientist laboratory of lymphoregulation of the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. Research interests: pharmaceutical technology and sorption technologies. ORCID.ORG/0000-0003-0812-4799 E-mail: [argentum.popova@mail.ru](mailto:argentum.popova@mail.ru).

**Karabinceva Natalia Olegovna** – Doctor of Sciences (Pharmacy), associate professor, the head of the Department of Pharmaceutical Technology and Biotechnology of Pharmaceutical Technology and Biotechnology of Novosibirsk State Medical University. Research interests: pharmaceutical technology. E-mail: [karnatol@yandex.ru](mailto:karnatol@yandex.ru).

---

**Рачковская Любовь Никифоровна** – кандидат химических наук, заведующий лабораторией лимфорегуляции НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Область научных интересов: технология создания сорбционных композиций.

**Толстикова Татьяна Генриховна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологических исследований ФГБУН НИОХ СО РАН. Область научных интересов: экспериментальная и фундаментальная фармакология и медицинская химия. E-mail: tg\_tolstikova@mail.ru.

**Котлярова Анастасия Анатольевна** – преподаватель кафедры экономики и управления фармации ФГБОУ ВО НГМУ; младший научный сотрудник лаборатории лимфорегуляции НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Область научных интересов: экспериментальная и фундаментальная фармакология, фармация. E-mail: kotlyarova.anastasiya@yandex.ru.

**Летягин Андрей Юрьевич** – руководитель филиала НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Область научных интересов: магнитно-резонансная томография.

**Rachkovskaya Lyubov Nikiforovna** – Candidate of Sciences (Chemistry), the Head of the laboratory of biological active compounds of the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. Research interests: sorption technologies.

**Tolstikova Tatyana Genrihovna** – Doctor of Sciences (Biology), the Head of the laboratory of pharmacological investigation of N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, professor. Research interests: an experimental and fundamental pharmacology and the medical chemistry. E-mail: tg\_tolstikova@mail.ru.

**Kotlyarova Anastasiya Anatolievna** – the lecturer of the Department of Economics and Management of Pharmacy of Novosibirsk State Medical University; the scientist of the laboratory of lymphoregulation of the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. Research interests: experimental and fundamental pharmacology and Economic fundamentals of pharmacy. E-mail: kotlyarova.anastasiya@yandex.ru.

**Letyagin Andrey Yurievich** – the Head of the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. Research interests: magnetic resonance imaging (MRI).

---

Поступила в редакцию: 05.05.2017

Принята к печати: 01.06.2017

Received: 05.05.2017

Accepted for publication: 01.06.2017

---

УДК 543.544.5:615.211:547 – 327

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ

Д.Р. Сабирзянов., Ю.Н. Карпенко, Т.Л. Малкова, И.В. Алексеева

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Минздрава России, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2  
E-mail: perm@pfa.ru

Анилокаин – местный анестетик из группы замещенных амидов, синтезированный в Пермской государственной фармацевтической академии. Анилокаин проявляет высокую поверхностноанестезирующую, инфильтрационную и проводниковую анестезию и показывает высокую эффективность в различных областях медицинской практики. Качество производимых лекарственных средств напрямую зависит от качества фармацевтических субстанций. Одним из важнейших параметров доброкачественности фармацевтических субстанций является их чистота. **Целью** настоящей работы явилась разработка и валидация методики определения специфических примесей в субстанции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). **Материалы и методы.** Исследования проведены на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» («Shimadzu», Япония), оснащенном диодноматричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическая колонка – «Zorbax SB-C18» (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм). Валидационная оценка разработанной методики проведена в соответствии с требованиями ГФ XIII и международными требованиями ICH (International Conference on Harmonization). **Результаты и обсуждение.** Эксперимент по выбору условий хроматографирования показал, что оптимальное разделение анилокаина и возможных примесей (как идентифицированных, так и неидентифицированных) методом обращенно-фазной ВЭЖХ наблюдается в изократическом режиме при использовании элюента на основе фосфатного буфера с pH 3 и ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, длина волны детектирования 210 нм. Время регистрации хроматограммы – 20 минут. **Заключение.** В результате проведенных исследований, разработана методика количественного определения примесей в субстанции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведенная процедура валидации аналитической методики установила ее специфичность, линейность, воспроизводимость и правильность. Данная методика включена в проект фармакопейной статьи на субстанцию анилокаина.

**Ключевые слова:** анилокаин, 2-броманилин, N-(2-бромфенил)акриламид, высокоэффективная жидкостная хроматография, посторонние примеси, валидация

## DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES IN THE ANILOCAINE SUBSTANCE BY HPLC METHOD

D.R. Sabirzyanov, Yu.N. Karpenko, T.L. Malkova, I.V. Alekseeva

Perm State Pharmaceutical Academy  
2, Plevaya st., Perm, 614990, Russia  
E-mail: perm@pfa.ru

Anilocaine is a local anesthetic from the group of substituted amides, synthesized in the Perm State Pharmaceutical Academy. Anilocaine shows high surface anesthetic, infiltration and conduction anesthesia and shows the high efficiency in the various fields of medical practice. The quality of produced medicines depends on the quality of pharmaceutical substances. The purity is one of the most important parameters of the quality of pharmaceutical substances. **The aim** of this work was the development and validation of methods for identification of specific impurities in the substance of anilocaine by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Materials and methods.** Studies were performed on liquid chromatography LC-20 Prominence (Shimadzu, Japan) equipped with a diode-array detector

### Для цитирования:

Сабирзянов Д.Р., Карпенко Ю.Н., Малкова Т.Л., Алексеева И.В. «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ». Фармация и фармакология. 2017;5(3):254-266. DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-254-266

© Сабирзянов Д.Р., Карпенко Ю.Н., Малкова Т.Л., Алексеева И.В., 2017

### For citation:

Sabirzyanov D.R., Karpenko Yu.N., Malkova T.L., Alekseeva I.V. "DETERMINATION OF RELATED IMPURITIES IN THE ANILOCAINE SUBSTANCE BY HPLC METHOD". Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):254-266. (In Russ.) DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-254-266

(SPD-M20A). Chromatographic column was Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Validation assessment of the developed method conducted in accordance with the requirements of FP XIII and international requirements ICH (International Conference on Harmonization). **Results and discussion.** An experiment on the selection of the conditions of chromatographically showed that optimal separation of anilocaine and possible impurities (identified and unidentified) by the method of reversed-phase HPLC is observed in isocratic mode, using an eluent based on phosphate buffer pH 3 and acetonitrile. The flow rate of mobile phase is 1 ml/min; wavelength detection is 210 nm. Time check chromatogram is 20 minutes. **Conclusion.** The method for the quantitative determination of impurities in the substance of anilocaine by high-performance liquid chromatography was developed as the result of the research. The validation procedure of the analytical methods established its specificity, linearity, precision and accuracy. This method is included in the project monograph on substance of anilocaine.

**Keywords:** anilocaine, 2-bromoaniline, N-(2-bromophenyl)acrylamide, high-performance liquid chromatography, related impurities, validation

**Введение.** Создание отечественных высокоэффективных лекарственных препаратов – одна из важнейших задач российского здравоохранения. В Пермской государственной фармацевтической академии синтезирован и совместно с ИТХ УрО РАН доведен до медицинского применения

местный анестетик из группы замещенных амидов – анилокаин (2-броманилид-3-диэтиламинпропановой кислоты гидрохлорид) (рис.1), проявляющий высокую поверхностноанестезирующую, инфильтрационную и проводниковую анестезию [1].

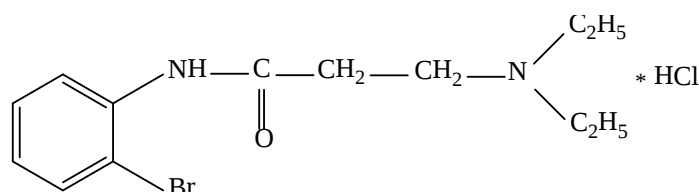


Рисунок 1 – Структурная формула анилокаина

Структурные аналоги анилокаина – лидокаин и тримекаин, давно использующиеся в медицинской практике, значительно уступают ему по выраженности поверхностноанестезирующего и антиаритмического действия [2]. Кроме того, лидокаин обладает высокой токсичностью, что обуславливает развитие различных осложнений при его применении [3]. Клинические исследования анилокаина доказали его высокую эффективность в различных областях медицины: хирургии, эндоскопии, стоматологии и т.д. [4]. Ряд лекарственных форм с анилокаином (инъекционные растворы, растворы для наружного применения, перевязочные средства) доведены до медицинского применения. С перспективой внедрения в медицинскую и ветеринарную практику разработаны и другие лекарственные средства для наружного применения: мазь «Анилкам», гель «Анилогель» для использования при проведении инструментальных вмешательств [5], суппозитории, пленки лекарственные [6], аэрозоль для обезболивания в ветеринарии.

Одним из важнейших параметров доброкачества фармацевтических субстанций является их чистота. На основании ранее проведенных исследований установлены направления распада молекулы анилокаина: гидролиз по амидной связи и реакция β-элиминирования. В нейтральной и слабощелочной среде преобладает процесс β-элиминирования, сопровождающийся выделением непредельного соединения и диэтиламина. Наряду с этим, идет частичный гидролиз по амидной связи. Структура непредельного соединения – N-(2-бромфенил)акриламида подтверждена данными элементного анализа и масс-спектрометрии. В сильноокислой среде происходит полное гидролитическое расщепление по амидной связи с выделением 2-броманилина.

Таким образом, специфическими примесями в субстанции могут являться N-(2-бромфенил)акриламид (продукт деструкции анилокаина) и 2-броманилин (как исходный продукт при синтезе и как продукт гидролитического расщепления анилокаина) (рис.2) [7].

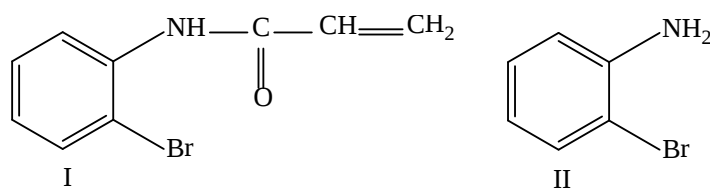


Рисунок 2 – Структурные формулы N-(2-бромфенил)акриламида (I) и 2-броманилина (II)

Временная фармакопейная статья (ВФС) на субстанцию анилокаина регламентирует определение

посторонних примесей методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе н-бутанол – этилацетат

– хлороформ – аммиака раствор концентрированный (20:20:10:0,5). В качестве детектора используются пары йода. Суммарное содержание посторонних примесей, оцененное по совокупности величины и интенсивности окраски их пятен на хроматограмме испытуемого раствора (2%раствор анилокаина в хлороформе), в сравнении с пятнами на хроматограммах свидетеля (0,01% раствора анилокаина) не должно превышать 0,5% [8].

Поскольку ТСХ является полуколичественным тестом, более предпочтительным в плане точности и специфичности для определения посторонних примесей является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [9].

**Целью** настоящей работы является разработка и валидация методики определения специфических посторонних примесей в субстанции анилокаина методом ВЭЖХ для дальнейшего ее включения в проект фармакопейной статьи предприятия.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали фармацевтическую субстанцию анилокаина (ВФС 42-2946-97), 2-броманилин («Sigma-Aldrich»), N-(2-бромфенил)акриламид (синтез вещества осуществлен по методике [5], хроматографическая чистота не менее 99%).

Исследования проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Shimadzu LC-20 Prominence» (Япония), оснащенном диодноматричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическая колонка – «Zorbax SB-C18» (4,6 мм × 250 мм, 5 мкм).

Регистрацию и обработку хроматографической информации осуществляли с помощью программного обеспечения «LCsolution» (ver.1,25).

Для приготовления элюентов использовали калия дигидрофосфат, фосфорную кислоту концентрированную, воду бидистиллированную, ацетонитрил (Криохром®, сорт 0). Значения pH подвижных фаз контролировали с помощью pH-метра «S400 SevenExcellence» («METTLER TOLEDO»).

**Результаты и обсуждение.** Эксперимент по выбору условий хроматографирования показал, что оптимальное разделение анилокаина и возможных

примесей (как идентифицированных, так и неидентифицированных) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ наблюдается в изократическом режиме при использовании фосфатного буфера с pH 3 со скоростью потока 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 210 нм. Время регистрации хроматограммы – 20 минут [7].

Для определения возможных примесей 0,1 г субстанции анилокаина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки метанолом (испытуемый раствор). 20 мкл раствора вводили в инжектор хроматографа. Идентификацию и количественное определение идентифицированных примесей осуществляли с использованием стандартных растворов N-(2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина.

На основании ранее полученных данных о содержании специфических примесей в серийных образцах субстанции, а также биологических испытаний при оценке безопасности примесей предложено нормировать содержание 2-броманилина – не более 0,01%; N-(2-бромфенил)акриламида – не более 0,1%; единичной неидентифицированной примеси – не более 0,1%; общего содержания примесей – не более 0,5% [7, 10].

Валидацию аналитической методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость, предел обнаружения и предел количественного определения в соответствии с современными требованиями [11, 12].

При подтверждении специфичности методики анализировали раствор модельной смеси субстанции анилокаина (4000 мкг/мл) и возможных примесей: N-(2-бромфенил)акриламида (4 мкг/мл) и 2-броманилина (0,4 мкг/мл) в метаноле (рис.3).

Выбранные хроматографические условия характеризуются высокой эффективностью (не менее 8000 ТТ), достаточной разрешающей способностью и воспроизводимостью. Рассчитанные критерии пригодности хроматографической системы удовлетворяют принятым критериям приемлемости (таблица 1).

**Таблица 1 – Оценка пригодности хроматографической системы**

|                                  | Время удерживания, мин | Коэффициент разделения (Rs) | Коэффициент асимметрии пика | Воспроизводимость инъекций (RSD) |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Анилокаин                        | 3,20±0,02              | –                           | –                           | –                                |
| Неидентифицированная примесь (I) | 6,22±0,02              | 6,15                        | 1,35                        | 1,05                             |
| N-(2-бромфенил)акриламид(II)     | 8,80±0,02              | 7,84                        | 1,51                        | 0,87                             |
| 2-броманилин (III)               | 11,30±0,03             | 6,40                        | 1,24                        | 0,52                             |
| Более 2                          |                        | Критерии приемлемости       |                             |                                  |
|                                  |                        | 0.75 – 2.5                  | Менее 5                     |                                  |

Линейность определяли на 7 уровнях концентраций: от 0,02% до 0,4% – для N-(2-бромфенил)акриламида, от 0,0014% до 0,044% – 2-броманилина (таблица 2). Каждый из приготовленных растворов хроматографировали 3 раза. Калибровочные

графики представлены на рис.4–5. Коэффициент корреляции в обоих случаях составил не менее 0,999, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций.

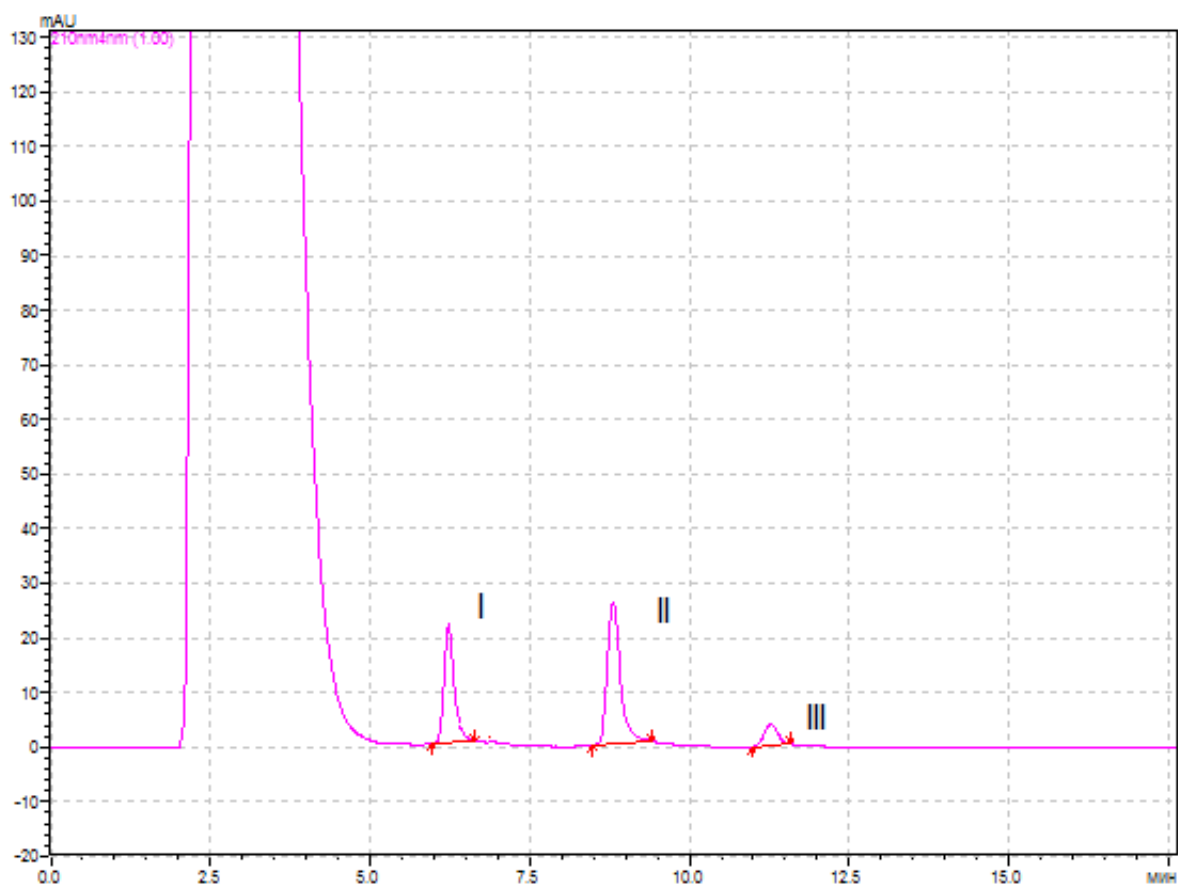


Рисунок 3 – Хроматограмма модельной смеси анилокаина, N-(2-бромфенил)акриламида (II) и 2-броманилина (III) (I – неидентифицированная примесь)

Таблица 2 – Определение линейности аналитической методики

| N-(2-бромфенил)акриламид                                                                                |                                          |                            | 2-броманилин                                                                                            |                                          |                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|
| Концентрация, мкг/мл                                                                                    | Концентрация, % от содержания анилокаина | Средняя площадь пика (n=3) | Концентрация, мкг/мл                                                                                    | Концентрация, % от содержания анилокаина | Средняя площадь пика (n=3) |
| 0,85                                                                                                    | 0,0213                                   | 95188                      | 0,055                                                                                                   | 0,00138                                  | 7794                       |
| 1,7                                                                                                     | 0,0425                                   | 18576                      | 0,11                                                                                                    | 0,00275                                  | 13598                      |
| 3,41                                                                                                    | 0,085                                    | 362138                     | 0,22                                                                                                    | 0,0055                                   | 26865                      |
| 5,12                                                                                                    | 0,128                                    | 573289                     | 0,33                                                                                                    | 0,0083                                   | 42907                      |
| 6,82                                                                                                    | 0,171                                    | 753534                     | 0,44                                                                                                    | 0,011                                    | 57927                      |
| 10,22                                                                                                   | 0,255                                    | 1164350                    | 0,88                                                                                                    | 0,022                                    | 116526                     |
| 17,04                                                                                                   | 0,426                                    | 1905517                    | 1,76                                                                                                    | 0,044                                    | 227928                     |
| Уравнение регрессии ( $Y = aX + b$ )<br>$a = 112011,7$ ; $b = 0,0$<br>Коэффициент корреляции: 0,9998136 |                                          |                            | Уравнение регрессии ( $Y = aX + b$ )<br>$a = 130047,7$ ; $b = 0,0$<br>Коэффициент корреляции: 0,9998507 |                                          |                            |

Повторяемость (сходимость) валидируемой методики оценивали при анализе модельных смесей субстанции анилокаина с содержанием примесей на 3 уровнях концентраций: 0,05%; 0,1% и 0,15% – для N-(2-бромфенил)акриламида; 0,005%; 0,01% и 0,015% – для 2-броманилина. Каждый из растворов хроматографировали в соответствии с разработан-

ной методикой 3 раза. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблицах 3-4. Установлено, что относительное стандартное отклонение (RSD) результатов измерений не превышает 10%, что свидетельствует об их удовлетворительной сходимости на всех уровнях рассмотренных концентраций.

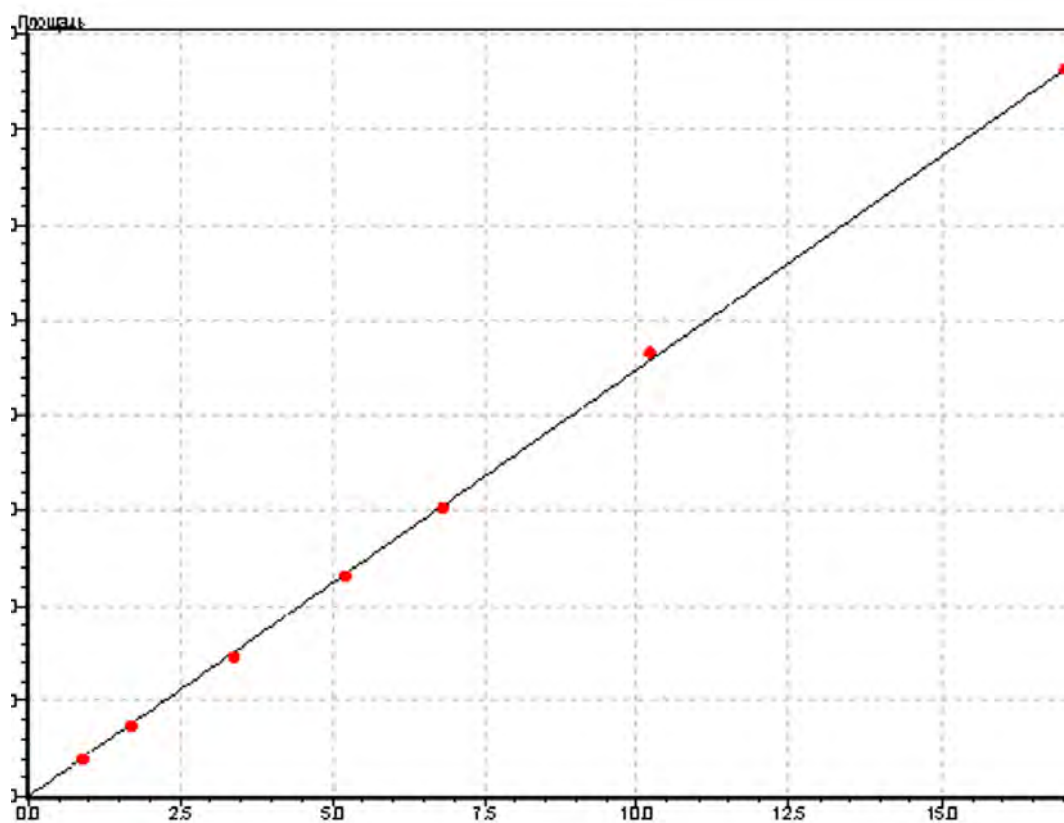


Рисунок 4 – Зависимость площади хроматографического пика от концентрации N-(2-бромфенил)акриламида

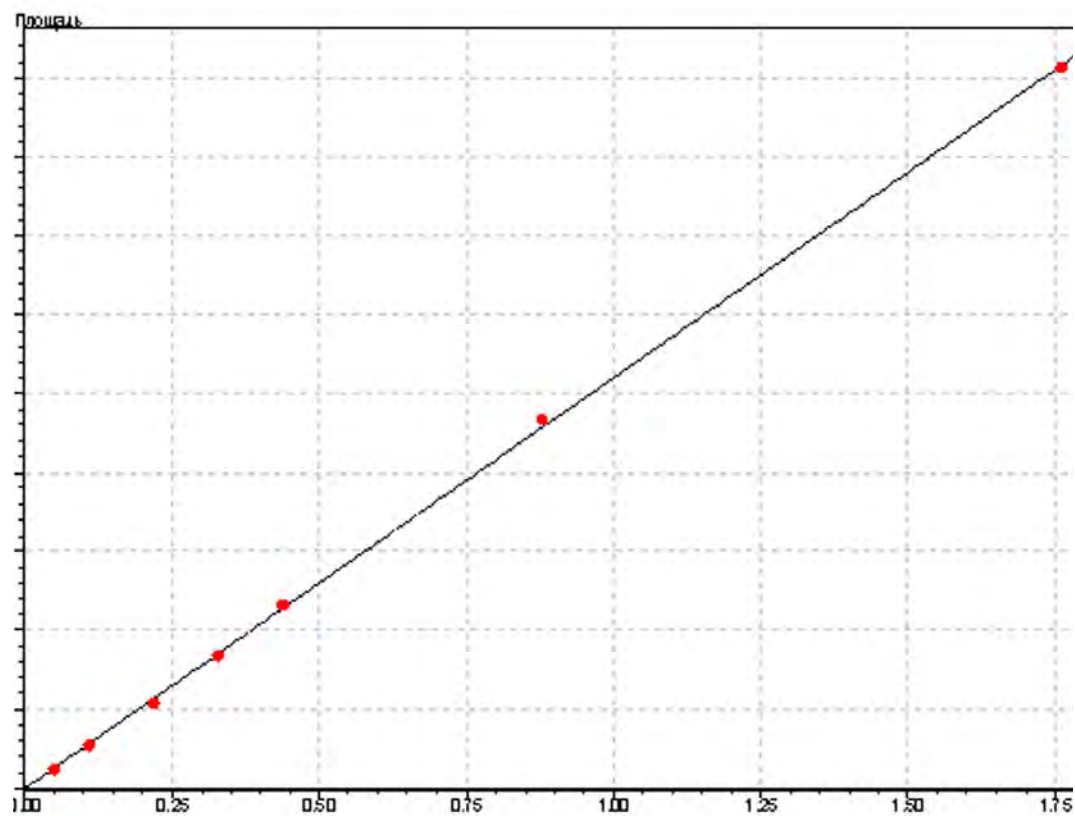


Рисунок 5 – Зависимость площади хроматографического пика от концентрации 2-броманилина

**Таблица 3 – Оценка повторяемости (сходимости) определения N-(2-бромфенил)акриламида**

| Содержание N-(2-бромфенил)акриламида в растворе, мкг/мл | Найденное содержание N-(2-бромфенил)акриламида, мкг/мл | Метрологические характеристики (n=6; P=0,95) |           |       |      |                  |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------|-------|------|------------------|
|                                                         |                                                        | n                                            | $\bar{X}$ | SD    | RSD  | $\Delta \bar{X}$ |
| 1,96 (0,049%)                                           | 2,11; 1,87; 2,07; 1,79; 1,91; 2,20                     | 6                                            | 1,99      | 0,128 | 6,44 | 0,13             |
| 3,92 (0,098%)                                           | 3,83; 3,74; 3,99; 4,21; 3,69; 4,16                     | 6                                            | 3,94      | 0,194 | 4,92 | 0,20             |
| 5,88 (0,147%)                                           | 6,08; 6,19; 5,91; 6,11; 5,82; 5,74                     | 6                                            | 5,98      | 0,142 | 2,37 | 0,15             |

**Таблица 4 – Оценка повторяемости (сходимости) определения 2-броманилина**

| Содержание 2-броманилина в растворе, мкг/мл | Найденное содержание 2-броманилина, мкг/мл | Метрологические характеристики (n=6; P=0,95) |           |        |      |                  |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------|--------|------|------------------|
|                                             |                                            | n                                            | $\bar{X}$ | SD     | RSD  | $\Delta \bar{X}$ |
| 0,212 (0,0053%)                             | 0,229; 0,216; 0,195; 0,209; 0,182; 0,202   | 6                                            | 0,206     | 0,0164 | 7,96 | 0,017            |
| 0,424 (0,0106%)                             | 0,418; 0,442; 0,430; 0,489; 0,399; 0,503   | 6                                            | 0,447     | 0,0323 | 7,22 | 0,034            |
| 0,636 (0,0159%)                             | 0,711; 0,632; 0,619; 0,606; 0,754; 0,698   | 6                                            | 0,670     | 0,0581 | 8,67 | 0,061            |

Правильность методики оценивали с помощью тестирования открываемости определяемых примесей, введенных в плацебо (субстанцию анилокаина). Исследования проводили на трех уровнях концентраций примесей (таблицы 5–6). Границы открываемости (2-бромфенил)акриламида и 2-броманилина

с учетом доверительного интервала не выходят за нормируемые пределы (75–125% – для примесей с содержанием от 0,1% до 1%; 50–150% – с содержанием менее 0,1%), что свидетельствует о правильности методики.

**Таблица 5 – Оценка правильности определения N-(2-бромфенил)акриламида**

| Содержание N-(2-бромфенил)акриламида | Открываемость (R), %                        | Метрологические характеристики (n=6; P=0,95) |           |      |      |                  |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------|------|------|------------------|
|                                      |                                             | n                                            | $\bar{R}$ | SD   | RSD  | $\Delta \bar{R}$ |
| 0,05%                                | 94,15; 104,30; 88,18; 90,52; 107,29; 104,33 | 6                                            | 98,13     | 7,68 | 7,83 | 8,21             |
| 0,1%                                 | 104,72; 96,22; 100,90; 93,71; 108,64; 94,18 | 6                                            | 99,73     | 5,55 | 5,57 | 5,82             |
| 0,15%                                | 97,30; 101,17; 104,62; 99,59; 106,16; 95,76 | 6                                            | 100,77    | 3,39 | 3,36 | 3,56             |

**Таблица 6 – Оценка правильности определения 2-броманилина**

| Содержание 2-броманилина | Открываемость (R), %                         | Метрологические характеристики (n=6; P=0,95) |           |      |      |                  |
|--------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------|------|------|------------------|
|                          |                                              | n                                            | $\bar{R}$ | SD   | RSD  | $\Delta \bar{R}$ |
| 0,005%                   | 107,2; 98,23; 104,26; 96,30; 92,05; 108,19   | 6                                            | 101,04    | 5,65 | 5,59 | 5,93             |
| 0,01%                    | 99,59; 106,82; 114,34; 95,02; 108,37; 97,17  | 6                                            | 103,55    | 6,91 | 6,67 | 7,25             |
| 0,015%                   | 105,36; 96,01; 101,25; 115,35; 94,96; 106,03 | 6                                            | 103,16    | 7,42 | 7,19 | 7,78             |

Предел обнаружения для 2-броманилина по тестируемой методике составил 0,015 мкг/мл (0,000375%

от содержания анилокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида – 0,1 мкг/мл (0,0025%).

Предел количественного определения 2-броманилина – 0,06 мкг/мл (0,0014% от содержания анилокаина), для N-(2-бромфенил)акриламида – 0,85 мкг/мл (0,02%).

**Заключение.** Таким образом, разработана методика количественного определения примесей в суб-

станции анилокаина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведенная процедура валидации аналитической методики установила ее специфичность, линейность, воспроизводимость и правильность. Данная методика включена в проект фармакопейной статьи на субстанцию анилокаина.

**Introduction.** The creation of highly efficient national medicines is one of the most important tasks of the Russian healthcare. In the Perm State Pharmaceutical Academy was synthesized and, together with ITC UB RAS, brought to medical use a

local anesthetic from the group of substituted amides – anilocaine (2-bromanilid-3-diethylaminopropanoic acid hydrochloride) (Fig. 1), which is showing the high surface anesthetic, infiltration and conduction anesthesia [1].

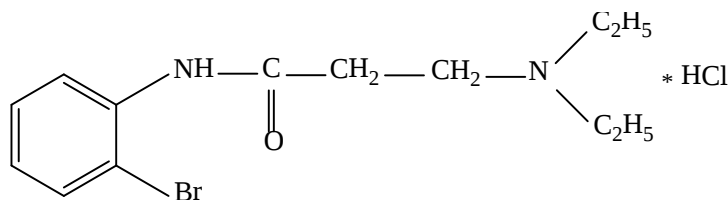


Figure 1 – Structural formula of anilocaine

Structural analogues of anilocaine lidocaine and trimecaine that have been for a long time used in medical practice, are greatly inferior to him in terms of the severity of surface anesthetic and antiarrhythmic action [2]. In addition, lidocaine has a high toxicity that causes the development of various complications during its application [3]. Clinical studies of anilocaine proved its high efficiency in the various areas of medicine: surgery, endoscopy, dentistry and other areas of medical practice [4]. Several dosage forms of anilocaine (solutions for injections, solutions for external use, dressings) brought to medical use. With prospect of implementation in the medical and veterinary practice, other drugs have been developed for external use: ointment “Anilcam” gel “Anilogel” for use during the instrumental interventions [5], suppositories, films drug [6], spray for anesthesia in the veterinary medicine.

The purity is one of the most important parameters

of quality of pharmaceutical substances. On the basis of previous studies hydrolysis of the amide link and the reaction of  $\beta$ -elimination are the main directions of degradation of the anilocaine molecules. The process of  $\beta$ -elimination prevails in neutral and slightly alkaline medium, accompanied by the allocation of an unsaturated compound and diethylamine. Along with this, partial hydrolysis takes place along the amide link. The structure of unsaturated compound N-(2-bromophenyl)acrylamide is confirmed by the data of elementary analysis and mass spectrometry. In the strong acidic medium, complete hydrolytic cleavage takes place along the amide link with the liberation of 2-bromoaniline.

Thus, the specific impurities in the substance can be N-(2-bromophenyl) acrylamide (the product of destruction of anilocaine) and 2-bromoaniline (as a starting material in the synthesis and as a product of hydrolytic cleavage of anilocaine) [7] (fig. 2).

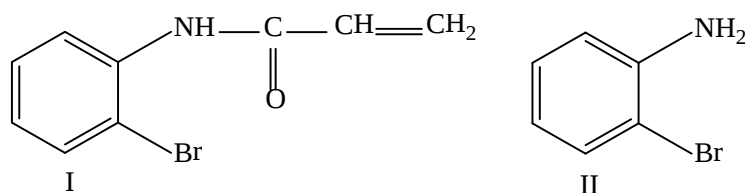


Figure 2 – Structural formulas of N-(2-bromophenyl)acrylamide (I) and 2-bromoaniline (II)

The Temporary Pharmacopoeia article (TPA) for the anilocaine substance regulates the determination of the foreign impurities by thin layer chromatography (TLC) in a n-butanol-ethylacetate-chloroform-ammonia solution, a concentrated solution (20:20:10:0.5). An iodine vapour is used as a detector. The total content of the foreign impurities estimated by the combination of the size and color intensity of their spots on the chromatogram of the test solution (2% solution of anilocaine in chloroform), in comparison with the spots on the witness

chromatograms (0,01% anilocaine solution) should not exceed 0,5% [8].

Since TLC is a semi-quantitative test, the method of high-performance liquid chromatography is more preferable in terms of accuracy and specificity for determining impurities [9].

**The aim** of this work is the development and validation of the procedure for the determination of the specific foreign impurities in anilocaine substance by HPLC for its further inclusion in the draft pharmacopoeia article of the enterprise.

**Materials and methods.** The pharmaceutical substance of anilocaine (TPA 42-2946-97), 2-bromoaniline (Sigma-Aldrich), N-(2-bromophenyl) acrylamide (the substance was synthesized according to the procedure of [5], the chromatographic purity is not less than 99%).

The studies were performed on a high-performance liquid chromatography Shimadzu LC-20 Prominence (Japan) equipped with a diode array detector (SPD-M20A). The chromatographic column was Zorbax SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm).

Registration and processing of chromatographic information was carried out with the use of the LCsolution software (ver.1.25).

Potassium dihydrogen phosphate, concentrated phosphoric acid, doubly distilled water, and acetonitrile (Criochrome®, grade 0) were used for the preparation of eluents. The pH values of the mobile phases were monitored using a pH meter S400 SevenExcellence (METTLER TOLEDO).

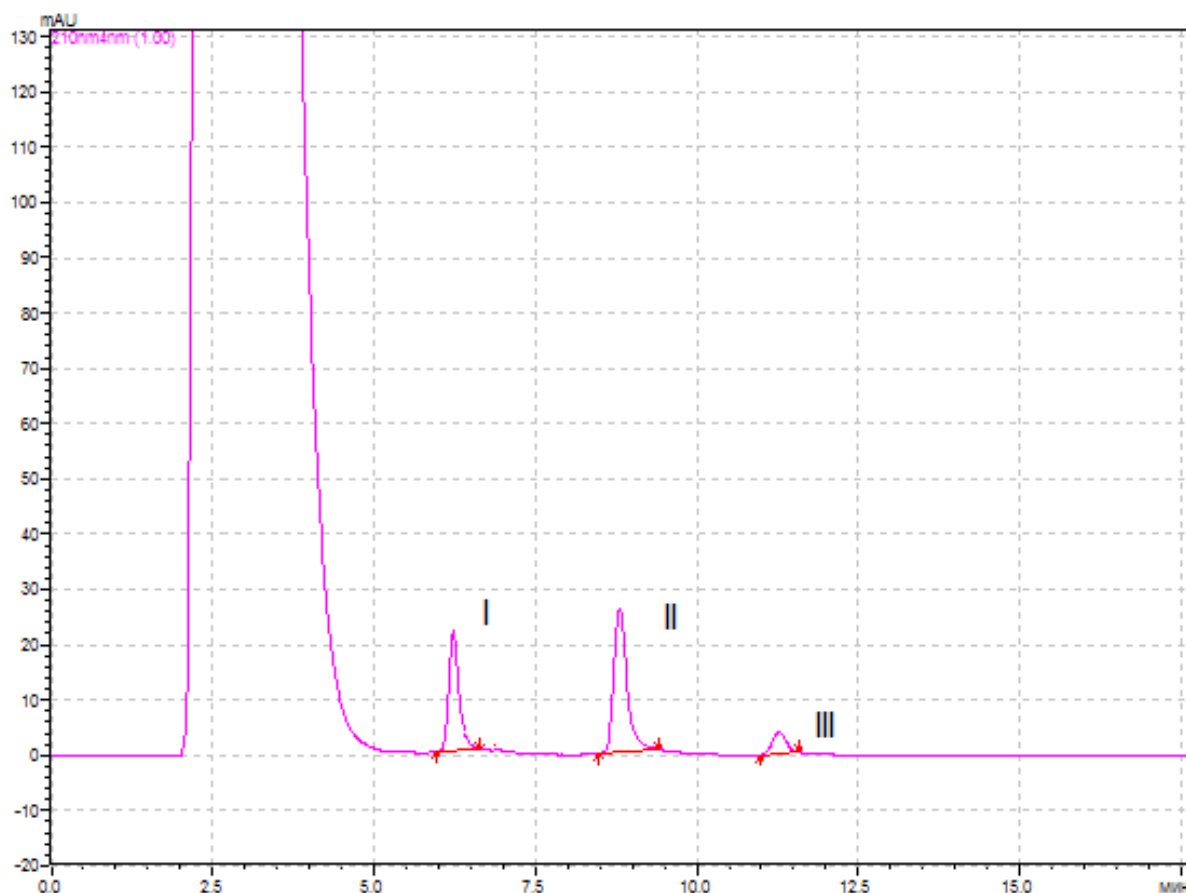
**Results and discussion.** The experiment on the choice of chromatographic conditions showed that the most optimal separation of anilocaine and possible impurities (both identified and unidentified) by reversed-phase HPLC was observed in the isocratic mode when phosphate buffer with pH 3 at a flow rate of 1 ml/min was used. Detection was carried out at a wavelength of 210 nm. The chromatogram registration time is 20 minutes [7].

To determine the possible impurities, 0,1 g of anilocaine substance was placed in a 25 ml volumetric flask and brought to the mark with methanol (test solution). 20 μl of the solution was injected into the chromatograph injector. Identification and quantitative determination of the identified impurities were carried out by using standard solutions of N-(2-bromophenyl) acrylamide and 2-bromoaniline.

Based on previously obtained data on the content of specific impurities in serial samples of the substance, as well as the biological tests in assessing the safety of impurities, it was suggested to normalize the content of 2-bromoaniline – not more than 0,01%; N-(2-bromophenyl)acrylamide – not more than 0,1%; with single unidentified impurity – not more than 0,1; total content of impurities – no more than 0,5% [7, 10].

The validation of the analytical technique was carried out according to the following characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision, detection limit, and quantification limit in accordance with the modern requirements [11, 12].

During confirmation of the specificity of the procedure, we analyzed a solution of a model mixture of anilocaine substance (4000 μg / ml) and possible impurities: N-(2-bromophenyl)acrylamide (4 μg / ml) and 2-bromoaniline (0,4 μg / ml) in methanol (fig. 3).



**Figure 3 – Chromatogram of the model mixture of anilocaine, N-(2-bromophenyl)acrylamide (II) and 2-bromoaniline (III) (I is an unidentified impurity)**

The selected chromatographic conditions are characterized by high efficiency (not less than 8,000 TT), sufficient resolving power and reproducibility.

The calculated criteria for the suitability of the chromatographic system has satisfied the accepted acceptance criteria (Table 2).

**Table 1 – Evaluation of the suitability of the chromatographic system**

|                                   | Retention time, min.  | Partition coefficient (Rs) | Coefficient of peak asymmetry | Reproducibility of injections (RSD) |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Anilocaine                        | 3.20±0.02             | -                          | -                             | -                                   |
| Unidentified impurity (I)         | 6.22±0.02             | 6.15                       | 1.35                          | 1.05                                |
| N-(2-bromophenyl) acrylamide (II) | 8,80±0,02             | 7.84                       | 1.51                          | 0.87                                |
| 2-bromoaniline (III)              | 11,30±0,03            | 6.40                       | 1.24                          | 0.52                                |
| More than 2                       | Eligibility criteria: |                            |                               |                                     |
|                                   |                       | 0.75 – 2.5                 | Less than 5                   |                                     |

*Linearity* was determined at 7 concentration levels: 0.02% to 0.4% for N-(2-bromophenyl) acrylamide, 0.0014% to 0.044% – 2-bromoaniline (Table 2). Each of the prepared solutions was chromatographed 3 times. The

calibration curves are shown in Fig. 4-5. The correlation coefficient in both cases was not less than 0,999, which indicates the linearity of the technique in the selected concentration range.

**Table 2 – Determination of the linearity of the analytical procedure**

| N-(2-bromophenyl)acrylamide                                                                         |                                       |                         | 2-bromoaniline                                                                                      |                                       |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| Concentration, µg / ml                                                                              | Concentration,% of anilocaine content | Average peak area (n=3) | Concentration, µg / ml                                                                              | Concentration,% of anilocaine content | Average peak area (n=3) |
| 0.85                                                                                                | 0.0213                                | 95188                   | 0.055                                                                                               | 0.00138                               | 7794                    |
| 1.7                                                                                                 | 0.0425                                | 18576                   | 0.11                                                                                                | 0.00275                               | 13598                   |
| 3.41                                                                                                | 0.085                                 | 362138                  | 0.22                                                                                                | 0.0055                                | 26865                   |
| 5.12                                                                                                | 0.128                                 | 573289                  | 0.33                                                                                                | 0.0083                                | 42907                   |
| 6.82                                                                                                | 0.171                                 | 753534                  | 0.44                                                                                                | 0.011                                 | 57927                   |
| 10.22                                                                                               | 0.255                                 | 1164350                 | 0.88                                                                                                | 0.022                                 | 116526                  |
| 17.04                                                                                               | 0.426                                 | 1905517                 | 1.76                                                                                                | 0.044                                 | 227928                  |
| The regression equation (Y = aX + b)<br>a = 112011,7; b = 0,0<br>Correlation coefficient: 0,9998136 |                                       |                         | The regression equation (Y = aX + b)<br>a = 130047,7; b = 0,0<br>Correlation coefficient: 0,9998507 |                                       |                         |

The precision of the validated procedure was evaluated in the analysis of model mixtures of anilocaine substance with an impurity content at 3 concentration levels: 0.05%; 0.1% and 0.15% for N-(2-bromophenyl)acrylamide; 0.005%; 0.01% and 0.015% for 2-bromoaniline. Each of the solutions was chromatographed 3 times

in accordance with the developed procedure. The results of the experiment are shown in Tables 4-5. It is established that the relative standard deviation (RSD) of the measurement results does not exceed 10%, which indicates their satisfactory convergence at all levels of the considered concentrations.

**Table 3 – Evaluation of the repeatability of the determination of N-(2-bromophenyl)acrylamide**

| Concentration of N-(2-bromophenyl)acrylamide, µg/ml | Measured concentration of N-(2-bromophenyl)acrylamide, µg/ml | Metrological characteristics (n=6; P=0.95) |           |       |      |                  |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|-------|------|------------------|
|                                                     |                                                              | n                                          | $\bar{X}$ | SD    | RSD  | $\Delta \bar{X}$ |
| 1.96 (0.049%)                                       | 2.11; 1.87; 2.07; 1.79; 1.91; 2.20                           | 6                                          | 1.99      | 0.128 | 6.44 | 0.13             |
| 3.92 (0.098%)                                       | 3.83; 3.74; 3.99; 4.21; 3.69; 4.16                           | 6                                          | 3.94      | 0.194 | 4.92 | 0.20             |
| 5.88 (0.147%)                                       | 6.08; 6.19; 5.91; 6.11; 5.82; 5.74                           | 6                                          | 5.98      | 0.142 | 2.37 | 0.15             |

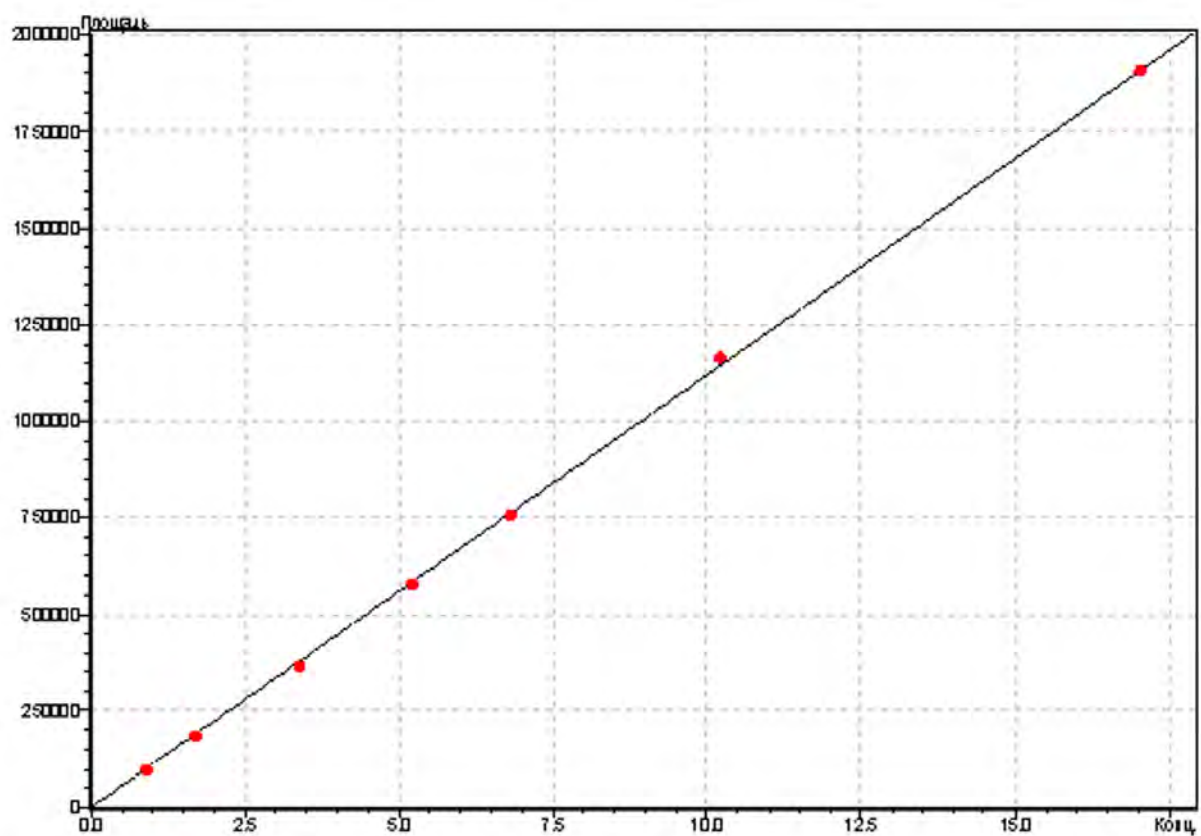


Figure 4 – Dependence of chromatographic peak area on concentration  
N-(2-bromophenyl)acrylamide

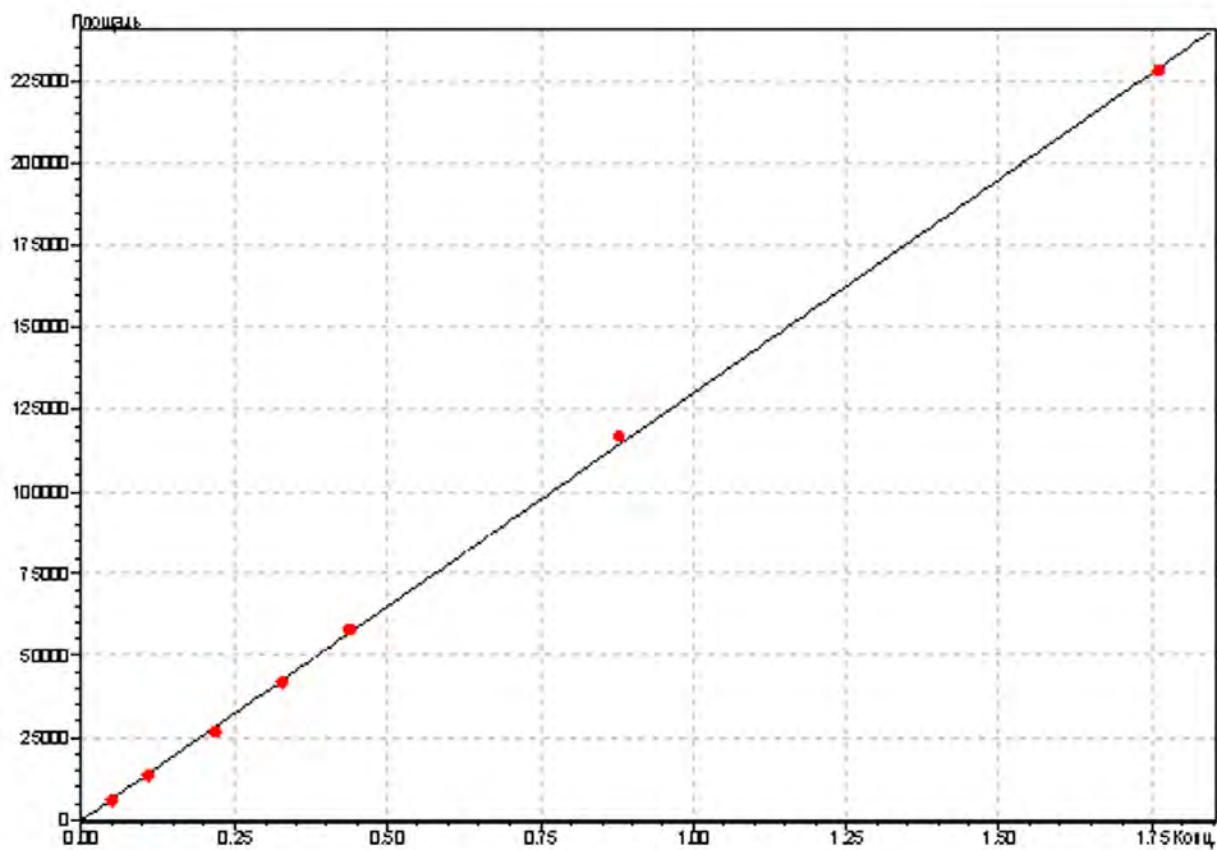


Figure 5 – Dependence of chromatographic peak area on concentration 2-bromoaniline

Table 4 – Evaluation of the repeatability of the determination of 2-bromoaniline

| Concentration of 2-bromoaniline, µg/ml | Measured concentration of 2-bromoaniline, µg/ml | Metrological characteristics (n=6; P=0.95) |           |        |      |                  |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|--------|------|------------------|
|                                        |                                                 | n                                          | $\bar{X}$ | SD     | RSD  | $\Delta \bar{X}$ |
| 0.212 (0.0053%)                        | 0.229; 0.216; 0.195;<br>0.209; 0.182; 0.202     | 6                                          | 0.206     | 0.0164 | 7.96 | 0.017            |
| 0.424 (0.0106%)                        | 0.418; 0.442; 0.430;<br>0.489; 0.399; 0.503     | 6                                          | 0.447     | 0.0323 | 7.22 | 0.034            |
| 0.636 (0.0159%)                        | 0.711; 0.632; 0.619;<br>0.606; 0.754; 0.698     | 6                                          | 0.670     | 0.0581 | 8.67 | 0.061            |

The accuracy of the procedure was assessed by testing the detectability of detectable impurities introduced into a placebo (anilocaine substance). Studies were carried out at three levels of impurity concentrations (Tables 6-7). The limits of the openability of N-(2-bromophe-

nyl) acrylamide and 2-bromoaniline with respect to the confidence interval do not exceed the normalized limits (75-125% for impurities with a content of 0,1 to 1%, 50-150% for less than 0,1%), which indicates the correctness of the technique.

Table 5 – Evaluation of the accuracy of the determination of (2-bromophenyl)acrylamide

| Concentration of N-(2-bromophenyl)acrylamide | Recovery (R), %                                | Metrological characteristics (n=6; P=0.95) |           |      |      |                  |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|------|------|------------------|
|                                              |                                                | n                                          | $\bar{R}$ | SD   | RSD  | $\Delta \bar{R}$ |
| 0.05 %                                       | 94.15; 104.30; 88.18;<br>90.52; 107.29; 104.33 | 6                                          | 98.13     | 7.68 | 7.83 | 8.21             |
| 0.1 %                                        | 104.72; 96.22; 100.90;<br>93.71; 108.64; 94.18 | 6                                          | 99.73     | 5.55 | 5.57 | 5.82             |
| 0.15%                                        | 97.30; 101.17; 104.62;<br>99.59; 106.16; 95.76 | 6                                          | 100.77    | 3.39 | 3.36 | 3.56             |

Table 6 – Evaluation of the accuracy of the determination of 2-bromoaniline

| Concentration of 2-bromoaniline | Recovery (R), %                                 | Metrological characteristics (n=6; P=0.95) |           |      |      |                  |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|------|------|------------------|
|                                 |                                                 | n                                          | $\bar{R}$ | SD   | RSD  | $\Delta \bar{R}$ |
| 0.005 %                         | 107.2; 98.23; 104.26;<br>96.30; 92.05; 108.19   | 6                                          | 101.04    | 5.65 | 5.59 | 5.93             |
| 0.01 %                          | 99.59; 106.82; 114.34;<br>95.02; 108.37; 97.17  | 6                                          | 103.55    | 6.91 | 6.67 | 7.25             |
| 0.015%                          | 105.36; 96.01; 101.25;<br>115.35; 94.96; 106.03 | 6                                          | 103.16    | 7.42 | 7.19 | 7.78             |

The detection limit for 2-bromoaniline according to the test procedure was 0.015 µg / ml (0.000375% of anilocaine content), for N-(2-bromophenyl)acrylamide 0.1 µg / ml (0.0025%).

The limit of quantitative determination of 2-bromoaniline is 0.06 µg / ml (0.0014% of anilocaine content), for N-(2-bromophenyl)acrylamide 0.85 µg / ml (0.02%).

**Conclusion.** Thus, a method has been developed for the quantitative determination of impurities in anilocaine substance by the method of high-performance liquid chromatography. The performed procedure of validation of the analytical technique established its specificity, linearity, reproducibility and correctness. This technique is included in the draft pharmacopoeia article on the substance of anilocaine.

## Библиографический список

1. Хорошкова Н.В., Панцуркин В.И., Шкляев В.С., Горнова Н.А., Прянишникова Н.Т. Гидрохлорид орто-броманилида  $\beta$ -диэтиламинопропионовой кислоты, проявляющий анестезирующую активность // Пат. №1146989. 1993.
2. Петропавловская Т.А., Чередник И.Л., Шейх-Заде Ю.Р., Богус С.К., Галенко-Ярошевский П.А. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ АНИЛОКАИНА И ЛИДОКАИНА ПРИ НЕЙРОГЕННОЙ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ // Кубанский научный медицинский вестник. 2009. №8. С. 59–62.
3. Хохлов В.Д., Круть М.И., Сашко С.Ю. АНАФИЛАКТИЧЕСКИЙ ШОК ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИДОКАИНА ПОСЛЕ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ КОЖНОЙ ПРОБЫ // Клиническая медицина. 2012. Т. 90. № 7. С. 62–64.
4. Панцуркин В.И., Алексеева И.В. Анилокаин, поиск, свойства. Начальный опыт применения лекарственных форм в медицинской практике. Пермь: Изд-во ГОУ ВПО ПГФА Роздрава, 2006. 173 с.
5. Алексеева И.В., Панцуркин В.И., Одегова Т.Ф., Рюмина Т.Е. РАЗРАБОТКА ОБЕЗБОЛИВАЮЩЕГО ГЕЛЯ «АНИЛОГЕЛЬ» ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ МАНИПУЛЯЦИЯХ В УРОЛОГИИ // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 12. С. 109–112.
6. Алексеева И.В., Рюмина Т.Е. ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПЛЁНОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ С АНИЛОКАИНОМ // Фундаментальные исследования. 2014. №12 (часть 1). С. 158–163.
7. Карпенко Ю.Н., Чашина С.В., Тумилович Е.Ю., Алексеева И.В. ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ АНИЛОКАИНА ПО ПОКАЗАТЕЛЮ ПОСТОРОННИЕ ПРИМЕСИ // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. URL: <https://science.education.ru/ru/article/view?id=11076> (дата обращения: 06.04.2017).
8. ВФС 42-2946-97 Анилокаин.
9. Ковалева Е.Л., Багирова В.Л., Шахназаров К.С. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ // Химико-фармацевтический журнал. 2010. Т. 44. № 1. С. 35–42.
10. Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
11. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е издание, в 3-х томах. URL: <http://www.femb.ru/feml>

## References

1. Horoshkova N.V., Pantsurkin V.I., Shklyayev V.S., Gornova N.A., Pryanishnikova N.T. Gidroklorid orto-bromanilida -dietilaminopropionovoj kisloty pro-yavlyayushchij anesteziyushchuyu aktivnost [Ortho-bromoanilide hydrochloride of  $\beta$ -diethylaminopropionic acid demonstrating anesthetic activity]. Pat. 1146989, Russia. 1993. (In Russ.)
2. Petropavlovskaya T.A., Cherednik I.L., Sheyk-Zade Yu.R., Bogus S.K., Galenko-Yaroshevskiy P.A. SRV-NITELNAYA HARAKTERISTIKA ANTIARITMICHESKOGO VLIYANIYA ANILOKAINA I LIDOKAINA PRI NEJROGENNOJ FIBRILLYACII PREDSEKDIJ [COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE ANTIARRHYTHMIC EFFECT OF ANILOCAINE AND LIDOCAINE IN NEUROGENIC ATRIAL FIBRILLATION]. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik [Kuban Scientific Medical bulletin]*. 2009. N 8(113). P.59-62. (In Russ.)
3. Khokhlov V.D., Krut' M.I., Sashko S.U. ANAFILAKTICHESKIJ SHOK PRI VVEDENII LIDOKAINA POSLE OTRICATELNOJ KOZHNOJ PROBY [ANAPHYLACTIC SHOCK WHEN LIDOCAINE IS ADMINISTERED AFTER A NEGATIVE SKIN TEST]. *Klinicheskaya medicina [Clinical medicine]*. 2012. Vol. 90, N 7. P. 62-64. (In Russ.)
4. Pantsurkin V.I., Alekseeva I.V. Anilokain poisk svojstva Nachalnyj opyt primeneniya lekarstvennyh form v medicinskoj praktike [Anilocaine, search, properties. Initial experience in the use of medicinal forms in medical practice]. Perm Izdatelstvo GOU VPO PGFA Rozdrava [Perm: Publishing house of the State Educational Institution of Higher Professional Education of the City of Roshrava], 2006. 173 p. (In Russ.)
5. Alekseeva I.V., Pantsurkin V.I., Odegova T.F., Ryumina T.E. RAZRABOTKA OBEZBOLIVAYUSHCHEGO GE-LYA ANILOGEL DLYA PRIMENENIYA PRI DIAGNOSTICHESKIH I LECHEBNYH MANIPULYACIYAH V UROLOGII [DEVELOPMENT OF ANALGESIC GEL "ANILOGEL" FOR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC MANIPULATIONS IN UROLOGY]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal [Chemical-Pharmaceutical Journal]*. 2012. Vol.46. N 12. P.109-112. (In Russ.)
6. Alekseeva I.V., Ryumina T.E. OBOSNOVANIE SOSTAVA I TEKHNologii PLENOK LEKARSTVENNYH S ANILOKAINOM [SUBSTANTIATION OF THE COMPOSITION AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL FILMS WITH ANILOCAINE]. *Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental Research]*. N 12 (part 1). 2014. P.158-163. (In Russ.)

7. Karpenko Yu.N., Chashchina S.V., Tumilovich E.Yu., Alekseeva I.V. ISSLEDOVANIYA V OBLASTI STANDARTIZACII SUBSTANCII ANILOKAINA PO POKAZATELYU POSTORONNIE PRIMESI [STUDIES IN THE FIELD OF STANDARDIZATION OF THE SUBSTANCE OF ANILOCAINE IN TERMS OF THE FOREIGN IMPURITY INDEX]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Current problems of science and education]. 2013. N 6. URL: <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=11076> (access data: 06.06.2017). (In Russ.)
8. TPA 42-2946-97 Anilocaine. (In Russ.)
9. Kovaleva E.L., Bagirova V.L., Shakhnazarov K.S. SOVERSHENSTVOVANIE METODOLOGICHESKIH PODHODOV K STANDARTIZACII FARMACEVTICHESKIH SUBSTANCIJ [IMPROVEMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO STANDARDIZATION PHARMACEUTICAL SUBSTANCES]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal* [Chemical-pharmaceutical magazine]. 2010. Vol.44. N 1. P.35-42. (In Russ.)
10. Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
11. Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH harmonized tripartite guideline. 2005. URL: <http://www.ich.org> (дата обращения: 06.04.2017).
12. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. 13-e izdanie. v 3-h tomah [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition, in 3 volumes]. URL: <http://www.femb.ru/feml> (In Russ.)

---

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

---

**Авторы:**

**Сабирзянов Денис Робертович** – ассистент кафедры токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и валидация аналитических методик, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: [denissabyrzanov@gmail.com](mailto:denissabyrzanov@gmail.com)

**Карпенко Юлия Николаевна** – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и валидация биоаналитических методик, исследования в области фармацевтического и химико-токсикологического анализа, фармакокинетические исследования, высокоэффективная жидкостная хроматография. E-mail: [karpenko\\_pfa@mail.ru](mailto:karpenko_pfa@mail.ru)

**Малкова Тамара Леонидовна** – доктор фармацевтических наук, заведующий кафедрой токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: разработка и совершенствование методик определения лекарственных средств, в том числе, имеющих токсикологическое значение, исследование новых психоактивных веществ, обеспечение качества аналитических исследований.

**Алексева Ирина Владимировна** – профессор фармацевтической технологии, Пермская государственная фармацевтическая академия. Область научных интересов: комплексные исследования с целью создания лекарственных форм на основе местного анестетика анилокаина.

**Autors:**

**Sabyrzanov Denis** – an assistant of the faculty of Toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and validation of analytical methods, high performance liquid chromatography. E-mail: [denissabyrzanov@gmail.com](mailto:denissabyrzanov@gmail.com)

**Karpenko Yulia** – Candidate of Sciences (Pharmacy), an associate professor of the faculty of Toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and validation of bioanalytical methods, studies in the field of pharmaceutical and chemical-toxicological analysis, pharmacokinetic studies, high performance liquid chromatography. E-mail: [karpenko\\_pfa@mail.ru](mailto:karpenko_pfa@mail.ru)

**Malkova Tamara** – Doctor of Sciences (Pharmacy), the Head of the faculty of Toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: development and improvement of methods for detection of drugs, including those of toxicological significance, the study of new psychoactive substances, quality assurance of analytical studies.

**Alekseeva Irina** – the professor of pharmaceutical technology, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: a complex study with the aim of development of medicinal forms on the basis of local anesthetic anilocaine.

УДК 547.458.88:582.998.1:543.5

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ШРОТА СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ (TAGETES PATULA L.)

**Н.М. Червонная, И.И. Харченко, С.Л. Аджирахметова, Л.П. Мыкоц,  
О.А. Андреева, Э.Т. Оганесян**

Пятигорский медико-фармацевтический институт –  
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,  
357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11  
E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

Большая молярная масса обуславливает ряд таких свойств, которые отсутствуют у низкомолекулярных соединений. Поэтому ее определение позволяет выявить некоторые физические и технологические свойства биополимеров и предсказать возможность практического применения. **Целью работы** явилось определение средней молярной массы, изучение поверхностных свойств на границе раздела фаз «раствор-воздух» и установление изоэлектрической точки водных растворов пектиновых веществ (ПВ), выделенных из шрота соцветий бархатцев распростертых. **Материалы и методы.** Полисахаридные комплексы выделяли из шрота соцветий бархатцев распростертых сорта «Сарген», оставшегося после трехкратной экстракции сырьем 40% спиртом этиловым, по методу Н.К. Кочеткова и М. Sinner. С помощью капиллярного вискозиметра Оствальда измерялось время истечения воды и растворов ПВ; рассчитывались различные виды вязкостей. Плотность растворов определялась пикнометрическим способом, однако, ввиду близости плотностей анализируемых растворов и воды их не учитывали при расчете относительной вязкости. Для определения поверхностной активности из 1% водных растворов ПВ готовили серию растворов с концентрацией от 0,01% до 0,5%. На приборе Ребиндера устанавливали перепады давлений манометрической жидкости в момент проскакивания пузырька воздуха на поверхности раствора ПВ. Изоэлектрическую точку (ИЭТ) ПВ мы определяли в ацетатном буферном растворе в пределах pH от 3,2 до 6,2 вискозиметрическим методом. **Результаты и обсуждение.** Фракционирование полученных полисахаридных комплексов показало, что выход пектиновых веществ составляет 2,2%. Расчет показывает, что средняя молярная масса ПВ составила 45272 г/моль. О степени взаимодействия макромолекул полимера и растворителя, о структурных свойствах макромолекулы, степени ее разветвленности можно судить по величине коэффициента Хаггинса. Найденная величина составила 1,46, что подтверждает невысокую растворимость ПВ в воде. Видимо, цепь биополимера разветвлена, что ухудшает растворимость макромолекул и в дальнейшем может способствовать гелеобразованию. ПВ, выделенные из шрота соцветий бархатцев распростертых относятся к группе поверхностно-активных веществ. Благодаря немалому поперечному сечению молекулы (S) и высокой средней молярной массе (45272 г/моль) молекулы занимают большой объем на поверхности раздела фаз. Установлено, что макромолекула находится в изоэлектрическом состоянии при pH = 4,7. **Заключение.** В результате проведенных исследований вискозиметрическим методом определена средняя молярная масса ПВ, равная 45272 г/моль. Установлена константа Хаггинса (1,46), связанная с невысокой растворимостью ПВ в воде. Установлено, что ПВ, выделенные из шрота соцветий бархатцев распростертых, являются поверхностно-активными. Показано, что макромолекула ПВ может находиться в состоянии полиамфиона при pH = 4,7.

**Ключевые слова:** пектиновые вещества, шрот соцветий бархатцев распростертых, средняя молярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, вискозиметр Оствальда

### Для цитирования:

Червонная Н.М., Харченко И.И., Аджирахметова С.Л., Мыкоц Л.П., Андреева О.А., Оганесян Э.Т.  
«ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ШРОТА СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ (TAGETES PATULA L.)».  
Фармация и фармакология. 2017;5(3):267-282.  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-267-282

© Червонная Н.М., Харченко И.И., Аджирахметова С.Л., Мыкоц Л.П., Андреева О.А., Оганесян Э.Т., 2017

### For citation:

Chervonnaya N.M., Kharchenko I.I., Adzhiakhmetova S.L., Mykots L.P., Andreeva O.A., Oganessian E.T. "DETERMINATION OF SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PECTIN SUBSTANCES FROM THE SOLVENT CAKE OF TAGETES PATULA L. INFLORESCENCES".  
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):267-282. (In Russ.)  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-267-282

## DETERMINATION OF SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PECTIN SUBSTANCES FROM THE SOLVENT CAKE OF TAGETES PATULA L. INFLORESCENCES

N.M. Chervonnaya, I.I. Kharchenko, S.L. Adzhiakhmetova, L.P. Mykots,  
O.A. Andreeva, E.T. Oganessian

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State  
Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, 357532, Russia

Big molecular weight conditions are responsible for some properties, which are absent in low molecular compounds. Therefore, its determination allows revealing of some physical and technological properties of biopolymers and prediction of the possibility of their practical application. The aim of this work was to determine an average molar weight, to study the superficial properties at the border of "solution-air" phases, and to establish an isoelectric spot of water solutions of pectin substances (PS), isolated from a solvent cake of *Tagetes patula* inflorescences. **Materials and methods.** Polysaccharide complexes were isolated from the solvent cake of *Tagetes patula* inflorescences of Carmen species which was left after a raw material extraction with ethanol 40% with the method of Kochetkov and M. Sinnera. The time of water and PS solutions flow out was measured by the use of a capillary Ostwald viscosimeter; different types of viscosity were calculated. The density of solutions was determined by using a picnometric method, however due to the closeness of density of the analyzed solutions and water, they were not considered in the calculation of the relative viscosity. Series of solutions with 0.01 to 0.5% concentrations were prepared from 1% PS water solutions to determine a surface activity. Monometric liquid tension variations were set in Reh binder's apparatus in the moment of an air bubble appearance on the surface of PS solution. Isoelectric spot (IES) of PS was determined in acetate buffer solution with pH within 3.2 to 6.2 by using the viscometer method. **Results and discussion.** Fractioning of the obtained polysaccharide complexes showed that efficiency of the pectin substances amounted to 2.2%. Calculation shows that an average molar weight of PS amounted to 45272 g/mol. About the degree of interaction between macromolecules of polymer and solvent, structural properties of macromolecule, the degree of its branching can be judged by the value of Huggins test. The value was found to be 1.46, which proves the low solubility of PS in water. Apparently, a biopolymer chain has been branched which worsen the solubility of macromolecules and further may promote the formation of gel condition. PS, isolated from the solvent cake of *Tagetes patula*, belong to the group of the surface active substances. Due to a big cross section of a molecule (S) and the high average molar weight, (45272 g/mol) molecules occupy a big volume at the surface of phase separation. We have established that macromolecule is in the isoelectric state at pH = 4.7. **Conclusion.** In the result of the studies using viscometer method, we have determined a molar weight of PS equal to 45272 g/mol. Huggins constant (1.46) which is connected to a low solubility of PS in water has been determined. We have established that PS, isolated from the solvent cake of *Tagetes patula*, are surface active. We have shown that PS macromolecule is in the state of polyamphion at pH = 4.7.

**Keywords:** pectin substances, solvent cake of *Tagetes patula*, average molar weight, surface activity, isoelectric spot, Ostwald viscometer

Ранее было установлено, что извлечение из соцветий бархатцев распростертых, полученное экстракцией спиртом этиловым 40%, проявляет выраженную антиоксидантную, эндотелиопротекторную и ранозаживляющую активность [1, 2]. С целью комплексного использования сырья в настоящей работе изучались некоторые физико-химические свойства пектиновых веществ, выделенных из шрота соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.). Большая молярная масса обуславливает ряд таких свойств, которые отсутствуют у низкомолекулярных соединений. Поэтому ее определение позволяет выявить некоторые физические и технологические свойства биополимеров и предсказать возможность практического применения [3].

Целью работы явилось определение средней молярной массы, изучение поверхностных свойств на границе раздела фаз «раствор-воздух» и установление изозлектрической точки водных растворов

пектиновых веществ (ПВ), выделенных из шрота соцветий бархатцев распростертых.

**Материалы и методы.** Полисахаридные комплексы выделяли из шрота соцветий бархатцев распростертых сорта «Carmen», оставшегося после трехкратной экстракции сырья 40% спиртом этиловым, по методу Н.К. Кочеткова и М. Sinner [4, 5] (рис. 1).

С помощью капиллярного вискозиметра Оствальда измерялось время истечения воды и растворов ПВ [6]; рассчитывались различные виды вязкостей. Плотность растворов определялась пикнометрическим способом, однако, ввиду близости плотностей анализируемых растворов и воды их не учитывали при расчете относительной вязкости. Для определения средней молярной массы готовилась серия водных растворов ПВ методом разведения в области концентраций (0,03–0,5%) [7].

Для расчета относительной вязкости  $\eta_{\text{rel}}$  использовали соотношение (формула 1):

$$\eta_{\text{отн}} = \eta/\eta_0 = \frac{t}{t_0} \times \frac{\rho}{\rho_0}, \quad (1),$$

где  $t_0$ ,  $t$  – время истечения воды и раствора ПВ, сек;

$\rho_0$ ,  $\rho$  – плотность воды и раствора ПВ соответственно, г/см<sup>3</sup>.

Удельную вязкость, то есть относительное приращение вязкости растворителя ( $\eta_0$ ) при введении в него полимера, находили по разнице (формула 2):

$$\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1, \quad (2),$$

Приведенную вязкость рассчитывали как отношение (формула 3):

$$\eta_{\text{пр}} = \eta_{\text{уд}}/C \quad (3),$$

где  $C$  – концентрация раствора.

Расчет средней молярной массы проводили по уравнению Марка-Хаувинка-Куна [7, 8] (формула 4):

$$[\eta] = K \times M^\alpha, \quad (4),$$

где  $K$ ,  $\alpha$  – константы,  $M$  – молярная масса.

« $\alpha$ » – величина, характеризующая форму макромолекулы и ее взаимодействие с молекулами растворителя. Для непригодных растворителей  $\alpha$ .

$K$  – коэффициент, постоянный для раствора данного полимерного ряда в данном растворителе. В расчетах использовали данные констант, характерных для большинства полисахаридов:  $K = 1,1 \cdot 10^{-5}$ ;  $\alpha = 1,2$  [8, 9].

Константу Хаггинса рассчитывали по уравнению (формула 5):

$$\eta_{\text{пр}} = [\eta] + K' \times [\eta] \times C^2, \quad (5)$$

принимая во внимание, что  $[\eta] \rightarrow 0$  и  $\eta_{\text{уд}}/C$ .

$K'$  определили по тангенсу угла наклона полученной прямой зависимости  $\eta_{\text{пр}}$  от  $C$ , не проходящей через начало координат (рис. 2) (формула 6):

$$K' = \text{tg } \alpha / [\eta]^2 \quad (6)$$

Для определения поверхностной активности из 1% водных растворов ПВ готовили серию растворов с концентрацией от 0,01% до 0,5%. На приборе Ребиндера устанавливали перепады давлений монометрической жидкости в момент проскакивания пузырька воздуха на поверхности раствора ПВ [7].

Величину поверхностного натяжения рассчитывали по уравнению (формула 7):

$$\sigma_x = \frac{\sigma_0 \times h_x}{h_0}, \quad (7)$$

где  $\sigma_x$ ,  $\sigma_0$  – поверхностное натяжение раствора и воды (Н/м);

$h_0$ ,  $h_x$  – перепад давлений монометрической жидкости над водой и раствором (см).

Зависимость между изменением свободной поверхностной энергии и концентрацией вещества в поверхностном слое выражена уравнением Гиббса (формула 8):

$$\Gamma = - \frac{\Delta\sigma}{\Delta C} \times \frac{C}{RT}, \quad (8)$$

где  $\Gamma$  – поверхностный избыток адсорбированного вещества;

$-\Delta\sigma/\Delta C$  – поверхностная активность;

$R$  – газовая постоянная ( $8,3110^3$  Дж/кмоль  $\times$  К);

$T$  – абсолютная температура, К

С учетом представлений о плотной упаковке молекул в монослой при предельной адсорбции ( $\Gamma_\infty$ ) мы вычислили площадь, занимаемую одной молекулой, толщину и объем поверхностного слоя (формулы 9, 10).

$$S = 1/\Gamma_\infty \times N_A, \quad (9)$$

где  $S$  – площадь молекулы;

$\Gamma_\infty$  – предельный поверхностный избыток;

$N_A$  – число Авогадро.

$$l = \Gamma_\infty \times M/\rho, \quad (10)$$

где  $l$  – толщина поверхностного слоя;

$M$  – молярная масса ПВ;

$\rho$  – плотность раствора ПВ.

По изотерме поверхностного натяжения определяли поверхностную активность ( $g$ ), которую рассчитывали по тангенсу угла, образованного касательной, проведенной к изотерме поверхностного натяжения при  $C \rightarrow 0$  (формула 11).

$$g = - \frac{\Delta\sigma}{\Delta C} = \text{tg } \alpha, \quad (11)$$

Изоэлектрическую точку (ИЭТ) ПВ мы определяли в ацетатном буферном растворе в пределах pH от 3,2 до 6,2 визкозиметрическим методом.



Рисунок 1 – Выделение полисахаридных комплексов

**Результаты и обсуждение.** Фракционирование полученных полисахаридных комплексов показало, что выход пектиновых веществ составляет 2,2%.

С возрастанием молярной массы полимеров обычно увеличивается вязкость их растворов, уменьшается растворимость.

Рассчитывались вязкости: относительная (фор-

мула 1), удельная (формула 2) и приведенная (формула 3). Результаты определения приведены в таблице 1. Экстраполяцией приведенной вязкости к нулевой концентрации находили предельное число вязкости – характеристическая вязкость. Такая процедура позволяет исключить из величины характеристической вязкости взаимодействие между молекулами.

Таблица 1 – Результаты измерения вязкости водных растворов ПВ из соцветий бархатцев

| C%     | t, сек | $\eta_{\text{отн}}$ | $\eta_{\text{уд}}$ | $\eta_{\text{пр}}$ |
|--------|--------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0      | 14,35  | -                   | -                  | -                  |
| 0,0313 | 16,61  | 1,157               | 0,157              | 5,016              |
| 0,0625 | 20,52  | 1,411               | 0,411              | 6,576              |
| 0,125  | 27,51  | 1,917               | 0,917              | 7,336              |
| 0,25   | 47,15  | 3,286               | 2,286              | 9,144              |
| 0,5    | 132,51 | 9,234               | 8,234              | 16,468             |

Далее строили график зависимости удельной вязкости от концентрации (рис. 2)

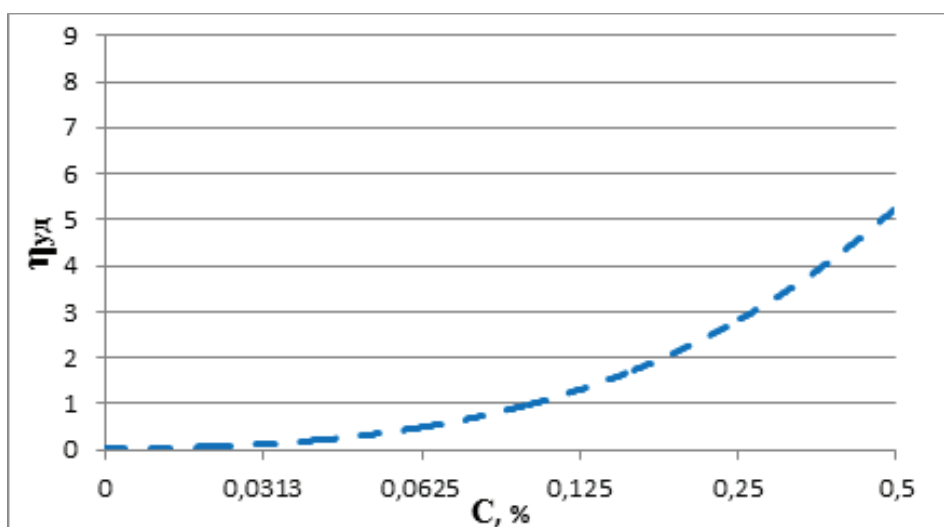


Рисунок 2 – Зависимость удельной вязкости от концентрации растворов ПВ

Из графика видно, что в области малых концентраций удельная вязкость плавно возрастает, однако, уже при концентрации 0,5% она резко возрастает, при этом кривая обращена выпуклостью к оси абсцисс.

Очевидно, даже при такой невысокой концентрации раствора ПВ начинается некое взаимодействие между молекулами, приводящее к структурированию раствора. Из этого следует, что определение характеристической вязкости необходимо проводить экстраполяцией к нулевой концентрации, когда зависимость  $\eta_{\text{пр}}$  от  $C$  будет линейной.

Характеристическую вязкость  $[\eta]$  находили графически по зависимости  $\eta_{\text{пр}} = f(C)$  (рис. 3). Для подтверждения линейной зависимости, целесообразно, на графике отложить зависимость  $\frac{\ln \eta/\eta_0}{C} = f(C)$ . Этот прием облегчает экстраполяцию, так как функция  $\ln \eta/\eta_0$  меньше изменяется с концентрацией.

На рисунке 3 представлена указанная зависимость приведенной вязкости от концентрации. Найденная величина  $[\eta]$  составила 4,25.

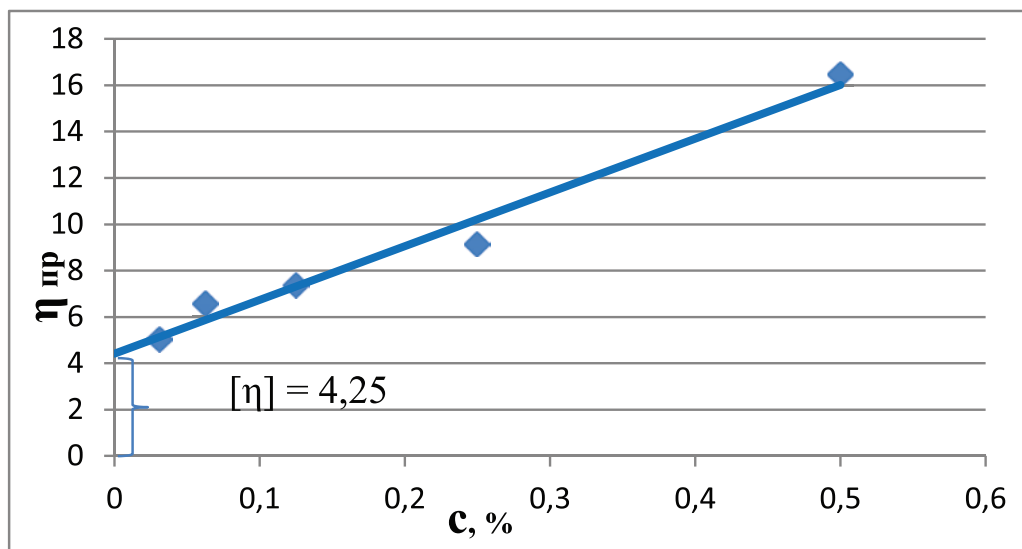


Рисунок 3 – Зависимость приведенной вязкости от концентрации растворов ПВ

Расчет средней молярной массы проводили по уравнению Марка-Хаувинка-Куна (формула 4), который показывает, что данная величина составила 45272 г/моль.

О степени взаимодействия макромолекул полимера и растворителя, о структурных свойствах макромолекул, степени ее разветвленности можно судить по величине коэффициента Хаггинса. Хотя,

чаще это используется для оценки сравнительной характеристики полимеров, полученных из различных объектов. В хороших растворителях значение константы Хаггинса находится в пределах 0,2–0,3.

Расчет коэффициента Хаггинса вели по формулам 5 и 6. Найденная величина составила 1,46, что подтверждает невысокую растворимость ПВ в воде. Видимо, цепь биополимера разветвлена, что ухудша-

ет растворимость макромолекул и в дальнейшем может способствовать гелеобразованию.

Величину поверхностного натяжения рассчитывали по формуле 7. Зависимость между изменением

свободной поверхностной энергии и концентрацией вещества в поверхностном слое выражена уравнением Гиббса (формула 9). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры поверхностных свойств ПВ

| C, %  | $C \cdot 10^5$ , кмоль/<br>$M^3$ | $\sigma \cdot 10^3$ , Н/м | $-\Delta\sigma \cdot 10^{-3}$ , Н/м | $\Gamma \cdot 10^8$ кмоль/<br>$M^2$ | $\Gamma_{\infty} \cdot 10^9$ | S, A <sup>2</sup> | I, A | V, A <sup>3</sup> |
|-------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------|------|-------------------|
| 0     |                                  | 71,97                     |                                     |                                     | 12,3                         | 13,5              | 5568 | 75168             |
| 0,015 | 0,347                            | 67,97                     | 3,99                                | 0,322                               |                              |                   |      |                   |
| 0,031 | 0,691                            | 66,65                     | 5,32                                | 0,429                               |                              |                   |      |                   |
| 0,062 | 1,380                            | 65,32                     | 6,65                                | 0,537                               |                              |                   |      |                   |
| 0,125 | 2,760                            | 62,65                     | 9,32                                | 0,753                               |                              |                   |      |                   |
| 0,250 | 5,520                            | 61,32                     | 10,65                               | 0,861                               |                              |                   |      |                   |
| 0,500 | 11,00                            | 58,65                     | 13,32                               | 1,076                               |                              |                   |      |                   |

Поскольку поверхностный слой поверхностно-активных веществ (ПАВ) на границе раздела фаз «раствор-воздух» является мономолекулярным, то определили величину предельного поверх-

ностного избытка ( $\Gamma_{\infty}$ ). С этой целью строили график зависимости  $1/\Gamma$  от  $1/C$  и по величине отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат, определили  $1/\Gamma_{\infty}$ . (рисунок 4)

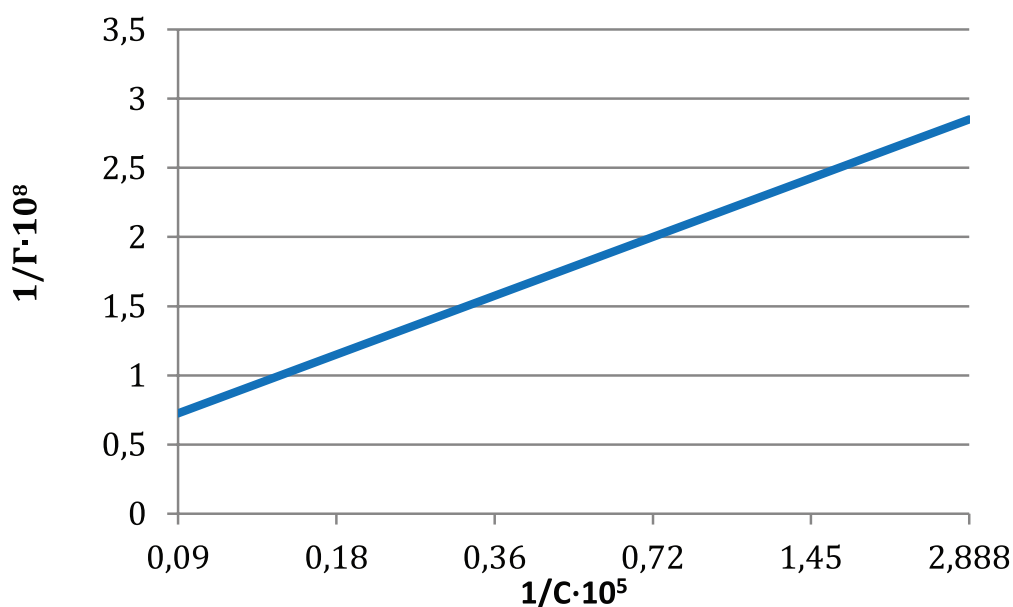


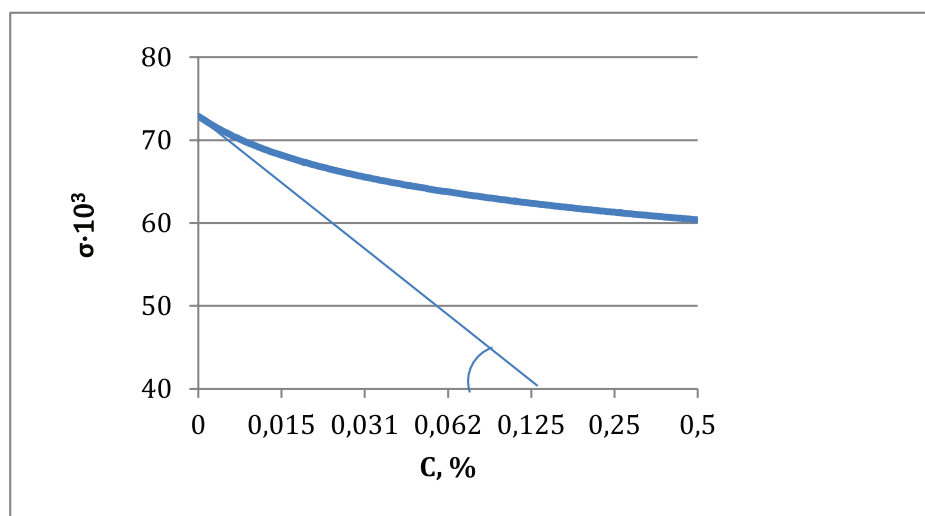
Рисунок 4 – Зависимость  $1/\Gamma$  от  $1/C$  для водных растворов ПВ

С учетом представлений о плотной упаковке молекул в монослой при предельной адсорбции ( $\Gamma_{\infty}$ ) мы вычислили площадь (формула 9), занимаемую одной молекулой, толщину (формула 10) и объем поверхностного слоя.

По изотерме поверхностного натяжения (рис. 5) определяли поверхностную активность ( $g$ ), которую рассчитывали по тангенсу угла, образованного касательной, проведенной к изотерме поверхностного натяжения при  $C \rightarrow 0$  (формула 11).

Тогда:

$$t g \alpha = 0,213 \frac{\text{Н/м}^2}{\text{кмоль}}.$$



**Рисунок 5 – Кривая зависимости поверхностного натяжения от равновесной концентрации раствора ПВ**

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ПВ, выделенные из шрота соцветий бархатцев распротертых, относятся к группе поверхностно-активных веществ. Благодаря немалому поперечному сечению молекулы (S) и высокой средней молярной массе (45272 г/моль) молекулы занимают большой объем на поверхности раздела фаз.

Одним из важных свойств ПАВ является способность к мицеллообразованию. Критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) определили графически по зависимости  $\sigma$  от  $\lg C$ .

Перегиб на изотерме соответствует началу формирования сферических мицелл. Для раство-

ров ПВ, найденная ККМ, составила 0,22 г на 100 г раствора.

Наличие мицеллообразования предполагает дальнейшее изучение солюбилизующей способности ПВ в водном растворе.

О структуре мицелл и природе полимера, обладающего поверхностно-активными свойствами, можно, в определенной степени, судить по термодинамическим функциям процесса мицеллообразования.

С этой целью рассчитывались: свободная энергия ( $\Delta G_M$ ), энтропия ( $\Delta S_M$ ), тепловой эффект ( $\Delta H_M$ ) процесса мицеллообразования [10]. Полученные данные представлены в таблице 3.

**Таблица 3 – Термодинамические функции мицеллообразования растворов ПВ в водной среде ( $T = 298\text{K}$ )**

| Вещество                       | $C_{\text{ККМ}}$ , кмоль/м <sup>3</sup> | $\Delta G_M$ , кДж/моль | $\Delta S_M$ , кДж/моль · К | $\Delta H_M$ , кДж/моль |
|--------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| ПВ из шрота соцветий бархатцев | $5,01 \cdot 10^{-5}$                    | -24,52                  | $8,2 \cdot 10^{-2}$         | -0,084                  |

Исходя из характеристик, представленных в таблице 3, можно считать, что мицеллообразование протекает самопроизвольно ( $\Delta G_M < 0$ ) и сопровождается незначительным экзотермическим эффектом ( $\Delta H_M < 0$ ), что связано с небольшой величиной критической концентрации мицеллообразования. Значения энтропии мицеллообразования независимо от структуры для большинства поверхностно-активных веществ находятся в пределах  $(4,28,4) \cdot 10 \text{ кДж/моль} \cdot \text{К}$  [11].

Рассчитанная величина  $\Delta S_M$  находится в этих пределах, что позволяет отнести ПВ к полиамфолитам. Определенное нами ранее значение pH, при котором полимер находится в изоэлектрическом состоянии, подтверждает высказанное предположение. Значение pH, при котором молекула ПВ находится в состоянии полиамфолита, составило 4,7.

Проведенные исследования показали, что ПВ, выделенные из шрота соцветий бархатцев распротертых, снижают поверхностное натяжение воды пропорционально его концентрации, проявляют мицеллообразующую способность, процесс мицеллообразования протекает самопроизвольно, молекула ПВ является полиамфолитом.

У слабых полиэлектролитов, к которым можно отнести ПВ, степень диссоциации полярных групп, а значит, и величина заряда зависит от pH. Эксперимент, проведенный ранее, показал пропорциональность зависимости сопротивления водных растворов ПВ, измеренного кондуктометрическим методом от концентрации. В связи с этим, представляло интерес изучить влияние pH раствора на его вязкость с целью определения наличия изоэлектрического состояния

(ИЭС) полиэлектролита, при котором он находится в состоянии полиамфиона.

Так как, в молекуле ПВ содержится больше карбоксильных групп, способных к диссоциации, то полиэлектролит является более сильной кислотой, чем основанием и его ИЭТ должна быть меньше 7.

ИЭТ ПВ мы определяли в ацетатном буферном растворе в пределах рН от 3,2 до 6,2 вискозиметрическим методом. В ИЭС молекулы полиэлектролита обычно свернуты в клубок и наименее гидратированы, поэтому в ИЭТ относительная вязкость обычно минимальна.

Если использовать полиэлектролиты в качестве

энтеросорбентов для адсорбции ионов солей тяжелых металлов, необходимо учитывать ИЭС и рН раствора. В ИЭС состоянии изменяются свойства полимера: снижается набухание, растворимость, электрическая проводимость, вязкость растворов и др. Это необходимо учитывать при разработке технологических схем для практического использования полимеров.

Для определения ИЭТ готовили 1% водный раствор ПВ и растворы ацетатного буфера с разным значением рН. К 10 мл буферного раствора добавляли 5 мл раствора ПВ, перемешивали и измеряли время истечения жидкости одинакового объема на вискозиметре. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Зависимость времени течения раствора ПВ от рН среды

| № п/п | рН  | t, сек | $\eta_{\text{отн}}$ |
|-------|-----|--------|---------------------|
| 1     |     | 27,82  |                     |
| 2     | 3,2 | 62,46  | 2,46                |
| 3     | 3,7 | 69,33  | 2,49                |
| 4     | 4,2 | 61,87  | 2,22                |
| 5     | 4,7 | 51,14  | 1,84                |
| 6     | 5,2 | 54,33  | 1,95                |
| 7     | 5,7 | 56,98  | 2,05                |

Графическая зависимость  $\eta_{\text{отн}}$  от рН (рис. 6) показала, что макромолекула ПВ находится в ИЭС при рН = 4,7.

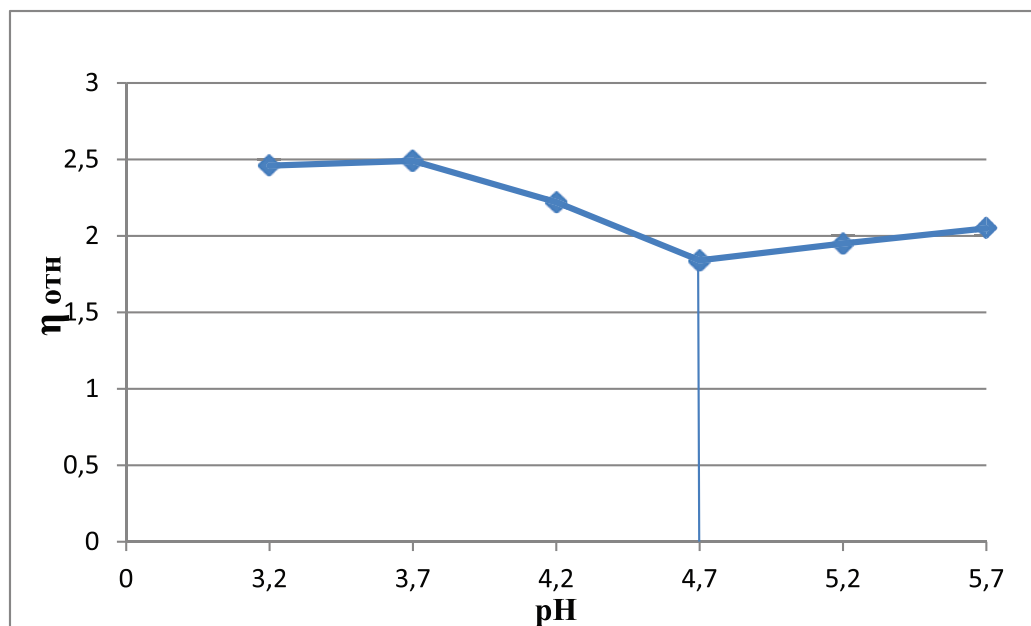


Рисунок 6 – Зависимость относительной вязкости 1% раствора ПВ от рН среды

Следовательно, благодаря малому объему клубка свернутой макромолекулы, уменьшается препятствие течению жидкости, что и приводит к минимуму относительной вязкости. Как с увеличением, так и с уменьшением рН вязкость раствора возрастет, так как макромолекулы распрямляются и их объем увеличивается. На рисунке видно, что при низком значении рН = 3,2 молекулярный клубок снова уплотняется, благодаря подавлению ионизации положительных

одноименно заряженных ионогенных групп, и вязкость снова уменьшается.

Значение ИЭТ полиэлектролита позволяет влиять на такие процессы, как набухание, застудневание, мембранное равновесие Доннама и др., что способствует правильному выбору того или иного технологического процесса или влияет на скорость протекания физиологического процесса.

**Заключение.** В результате проведенных исследова-

дований вискозиметрическим методом определена средняя молярная масса ПВ, равная 45272 г/моль. Установлена константа Хаггинса (1,46), связанная с невысокой растворимостью ПВ в воде. Установлено,

что ПВ, выделенные из шрота соцветий бархатцев распротертых, являются поверхностно-активными. Показано, что макромолекула ПВ может находиться в состоянии полиамфиона при pH = 4,7.

**Introduction.** It was previously established, that extracts from *Tagetes patula*, obtained by ethanol 40% extraction, exhibit a signified antioxidant, endothelioprotective, and wound healing activity [1, 2]. On purpose of the complex use of the raw material, we have studied some physical and chemical properties of pectin substances isolated from the solvent cake of *Tagetes patula* in this work. A big molar weight condition is responsible for the range of such properties, which usually are absent in the low-molecular compounds. Therefore, its determination allows the revelation of some physical and technological properties of biopolymers and prediction of possibility of their practical application [3].

**The aim of the work** was the determination of an average molar weight, study of the surface properties at the border of "solution-air" phases and the establishment of an isoelectric spot of water solutions of pectin substances (PS), obtained from the solvent cake of *Tagetes patula*.

**Materials and methods.** Polysaccharide complexes were isolated from the solvent cake of *Tagetes patula* of Carmen species, which were left after the triple extraction of the raw materials with ethanol 40% by the method of Kochetkov and M. Sinnera [4, 5] (fig. 1).

The time of water's and PS solutions' flow out was calculated using the capillary Ostwald viscometer [6]; the different viscosity types were calculated. Solutions' density was determined by using picnometric method, however due to the closeness of density of the analyzed solutions and water; they were not taken into consideration while calculating a relative viscosity. To determine an average molar mass, a series of PS water solution was prepared in concentrations of 0.03-0.5% [7].

To calculate a relative viscosity  $\eta_{\text{rel}}$ , we used a following correlation (formula 1):

$$\eta_{\text{rel}} = \eta_{\text{th}} = \frac{t \times \rho}{t_0 \times \rho_0}, \quad (1),$$

where  $t_0$ ,  $t$  is time of water's and PS solution' flow out, sec;

$\rho_0$ ,  $\rho$  is density of water and PS solution, respectively, g/cm<sup>3</sup>.

The specific viscosity, i.e. relative incremental value of solvent viscosity ( $\eta_0$ ) at introduction of polymer into it, was calculated by the difference (formula 2):

$$\eta_{\text{yd}} = \eta_{\text{th}} - 1, \quad (2),$$

The modified viscosity was calculated as a correlation (formula 3):

$$\eta_{\text{mod}} = \eta_{\text{rel}}/C \quad (3),$$

where,  $C$  is a solution concentration.

Calculation of an average molar weight was done by using Mark-Houwink-Kuhn equation [7, 8] (formula 4):

$$[\eta] = K \times M^a, \quad (4),$$

where,  $K$ ,  $a$  – constants,  $M$  – molar weight.

« $a$ » is a value, which characterizes a form of a macromolecule and its interaction with the solvent molecules.

For unusable solvents,  $a \geq 1$ .

$K$  is a coefficient, which is constant for the solvent of these polymer series in this solvent. Data of constants, characteristic for the majority of polysaccharides, were used in the calculations:  $K = 1.1 \times 10^{-5}$ ;  $a = 1.2$  [8, 9].

Huggins constant was calculated by using the following equation (formula 5):

$$\eta_{\text{sp}} = [\eta] + K' \times [\eta] \times C, \quad (5)$$

with taking into account that  $[\eta] \rightarrow 0$  и  $\eta_{\text{rel}}/C$ .

$K'$  was determined by the tangent of as slope angle of a direct correlation  $\eta_{\text{mod}}$  and  $C$ , which does not pass through the point of reference (fig. 2) (formula 6):

$$K' = \text{tg } \alpha / [\eta]^2 \quad (6)$$

To determine the surface activity from 1% water solutions of PS, series of solutions with 0.01 to 0.5% concentrations were prepared. Variations of monometric liquid tensions were set on Reh binder apparatus at the moment of the air bubble appearance at the PS solution surface [7].

Value of superficial tension was calculated by using the equation (formula 7):

$$\sigma_x = \frac{\sigma_0 \times h_x}{h_0}, \quad (7)$$

where  $\sigma_x$ ,  $\sigma_0$  – superficial tension of solution and water (H/M);

$h_0$ ,  $h_x$ , – variation of tensions of monometric liquid above water and solution (cm).

Dependence between the change of the free superficial energy and the concentration of a substance in a superficial layer is expressed by the Gibbs equation (formula 8):

$$\Gamma = - \frac{\Delta\sigma}{\Delta C} \times \frac{C}{RT}, \quad (8)$$

where  $\Gamma$  is a superficial excess of adsorbed substance;  $-\Delta\sigma/\Delta C$  – superficial activity;

$R$  – a gas constant ( $8,31 \cdot 10^3$  J/kmol  $\times K$ );

$T$  – an absolute temperature, K

With consideration of the densely packed molecules in monolayer at the limit adsorption ( $\Gamma_\infty$ ), we calculated the square that is occupied by one molecule, thickness and volume of a superficial layer (formulas 9, 10).

$$S = 1/\Gamma_\infty \times N_A, \quad (9)$$

where  $S$  is a molecule square;

$\Gamma_\infty$  – limit superficial excess;

$N_A$  – Avogadro's number.

$$l = \Gamma_{\infty} \times M/\rho, \quad (10)$$

where  $l$  is thickness of a superficial layer;

$M$  – the molar weight of PS;

$\rho$  – PS solution's density.

The superficial activity was determined by the superficial tension isotherm ( $g$ ), which was calculated by the

angle tangent, that was formed by a tangent line, traced to isotherm of superficial tension at  $C \rightarrow 0$  (formula 11).

$$g = - \frac{\Delta\sigma}{\Delta C} = \operatorname{tg} \alpha, \quad (11)$$

We determined an isoelectric spot (IES) of PS in the acetate buffer solution within pH 3.2 to 6.2 by using viscometer method.

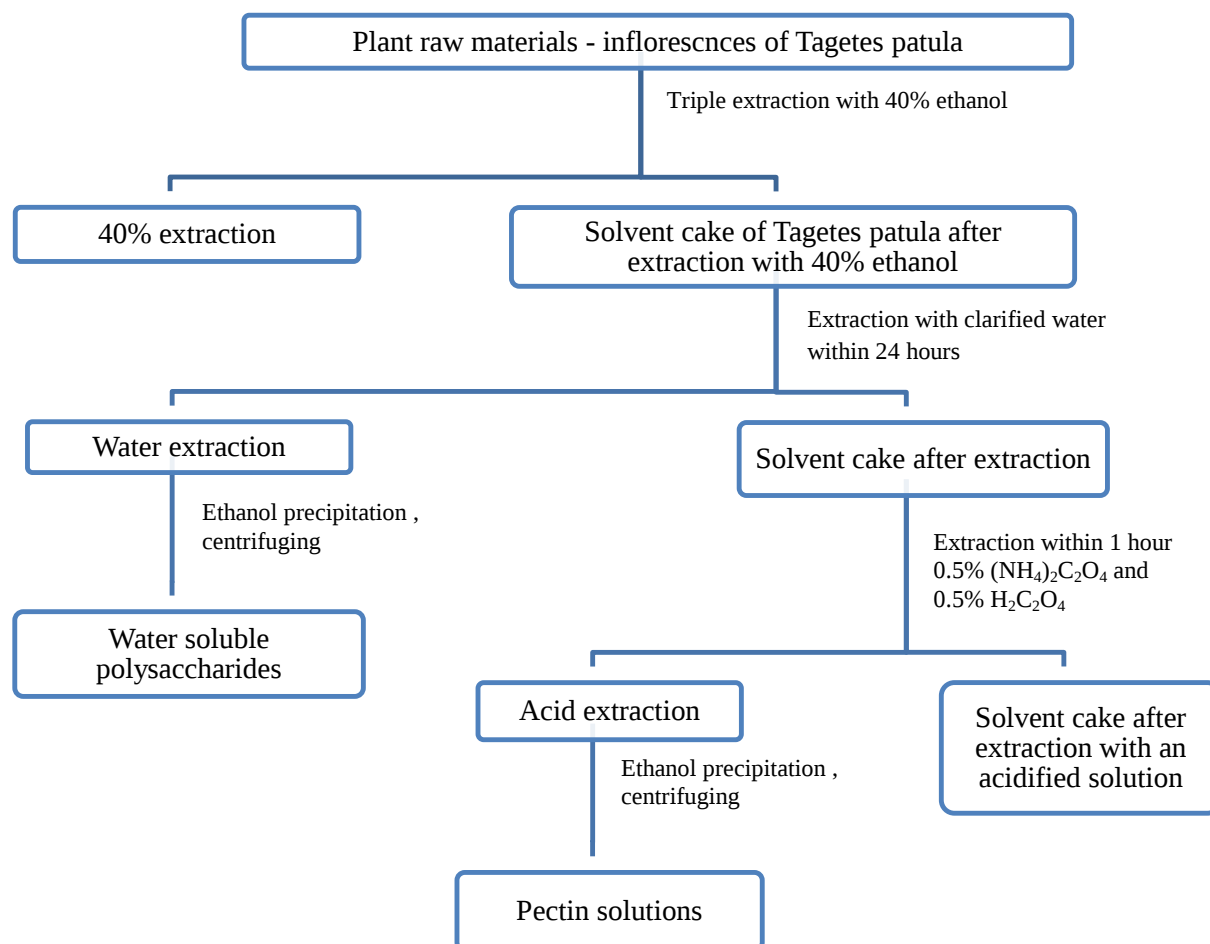


Figure 1 – Isolation of polysaccharide complexes

**Results and discussion.** Fractioning of the obtained polysaccharides showed that pectin substances' efficiency amounts to 2.2%.

When the molar weight increases, its solutions viscosity usually increases as well, and solubility decreases.

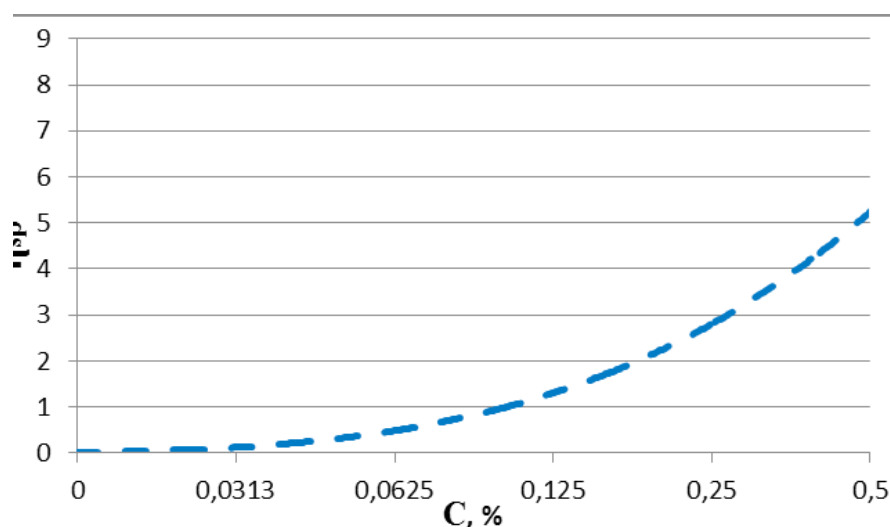
The following viscosities were calculated: relative (formula 1), specific (formula 2) and

modified (formula 3). The results of the determination are shown in the table 1. The marginal value of viscosity – characteristic viscosity was found by an extrapolation of the modified viscosity to zero concentration. This procedure allows excluding the interaction among molecules from the value of a characteristic viscosity.

Table 1 – Results of viscosity calculations of PS water solutions from the inflorescences of Tagetes patula

| C%     | t, sec | $\eta_{rel}$ | $\eta_{sp}$ | $\eta_{mod}$ |
|--------|--------|--------------|-------------|--------------|
| 0      | 14.35  | -            | -           | -            |
| 0.0313 | 16.61  | 1.157        | 0.157       | 5.016        |
| 0.0625 | 20.52  | 1.411        | 0.411       | 6.576        |
| 0.125  | 27.51  | 1.917        | 0.917       | 7.336        |
| 0.25   | 47.15  | 3.286        | 2.286       | 9.144        |
| 0.5    | 132.51 | 9.234        | 8.234       | 16.468       |

After that, the graph of dependence of specific viscosity from the concentration was built (fig. 2)



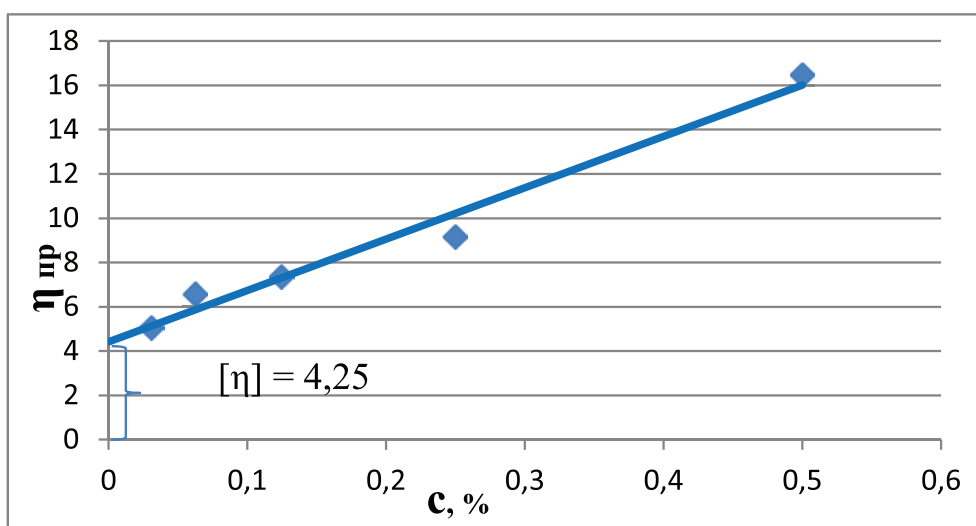
**Figure 2 – Dependence of the specific viscosity from the PS solutions concentration**

The graph shows that in the area of small concentrations, the specific viscosity has been slowly increasing, however at 0.5% concentration it increases sharply, while the curve's concavity faces abscise axis.

It is apparent that even in such small concentrations of PS solution there is an interaction among molecules, which leads to a solution structuring. It follows that the determination of the characteristic viscosity needs to be carried out with the extrapolation to zero concentration, when dependence of  $\eta_{\text{mod}}$  from C will be linear.

Characteristic viscosity  $[\eta]$  was found on graphic by using dependence  $\eta_{\text{mod}} = f(C)$  (figure 3). For confirmation of the linear dependence, it is reasonable to put dependence  $\frac{\ln \eta/\eta_0}{C} = f(C)$  on a graph. This method makes extrapolation easier, since function  $\ln \eta/\eta_0$  changes less with concentration.

The figure 3 shows the certain dependence of the modified viscosity from the concentration. The value discovered  $[\eta]$  amounted to 4.25.



**Figure 3 – Dependence of the modified viscosity from the concentration of PS solutions**

Calculation of an average molar weight was carried out using Mark-Houwink-Kuhn equation (formula 4), which shows that this value amounted to 45272 g/mol.

The degree of polymer and solvent macromolecules interaction, structural properties of macromolecules, degree of its branching can be judged by the value of Huggins test. Although, it is more often used for a comparative analysis of polymers obtained from different

objects. In good solvents the value of Huggins constant is within 0.2.-0.3.

Calculation of Huggins test was carried out according to formulas 5 and 6. The found value amounted to 1.46, which proves low solubility of PS in water. Apparently, the biopolymer chain is branched, which worsen the solubility of macromolecules and further may lead to gel formation.

The value of superficial tension was calculated by

using formula 7. The dependence between free superficial energy variation and concentration of a substance in the

superficial layer is expressed by Gibbs equation (formula 9). The results are presented in table 2.

Table 2 – Parameters of superficial properties of PS

| C, %  | $C \cdot 10^5$ ,<br>kmol/m <sup>3</sup> | $\sigma \cdot 10^3$ , H/m | $-\Delta\sigma \cdot 10^{-3}$ ,<br>H/m | $\Gamma \cdot 10^8$ ,<br>kmol/m <sup>2</sup> | $\Gamma_{\infty} \cdot 10^9$ | S, A <sup>2</sup> | l, A | V, A <sup>3</sup> |
|-------|-----------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------|------|-------------------|
| 0     |                                         | 71.97                     |                                        |                                              | 12.3                         | 13.5              | 5568 | 75168             |
| 0.015 | 0.347                                   | 67.97                     | 3.99                                   | 0.322                                        |                              |                   |      |                   |
| 0.031 | 0.691                                   | 66.65                     | 5.32                                   | 0.429                                        |                              |                   |      |                   |
| 0.062 | 1.380                                   | 65.32                     | 6.65                                   | 0.537                                        |                              |                   |      |                   |
| 0.125 | 2.760                                   | 62.65                     | 9.32                                   | 0.753                                        |                              |                   |      |                   |
| 0.250 | 5.520                                   | 61.32                     | 10.65                                  | 0.861                                        |                              |                   |      |                   |
| 0.500 | 11.00                                   | 58.65                     | 13.32                                  | 1.076                                        |                              |                   |      |                   |

Since the superficial layer of surface-active substances (SAS) at the border of solution-air is monomolecular, the value of limit superficial excess was determined ( $\Gamma_{\infty}$ ).

With this purpose the dependence graph of  $1/\Gamma$  from  $1/C$  was built, and  $1/\Gamma_{\infty}$  was determined by the size of an interval, cut off by the right line at the vertical axis (fig. 4).

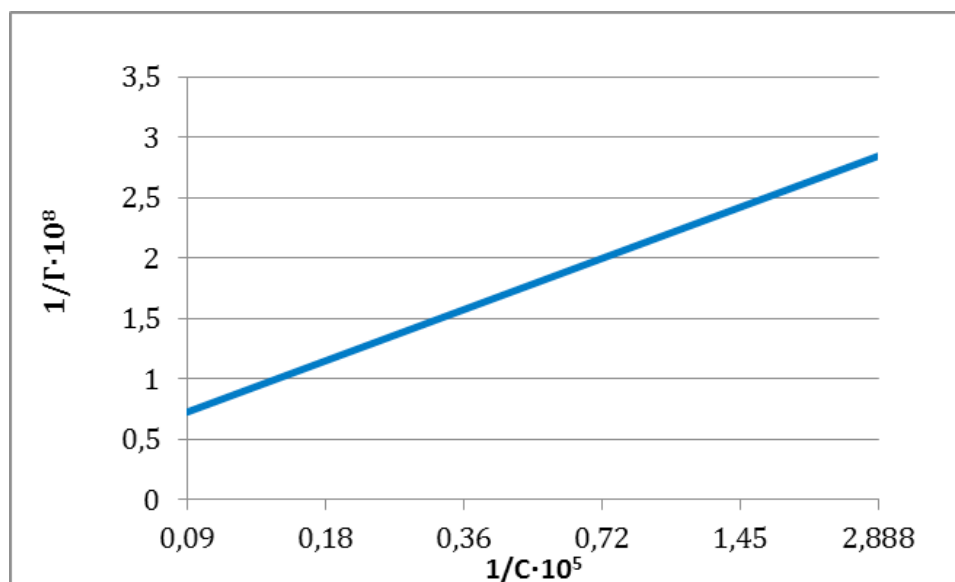


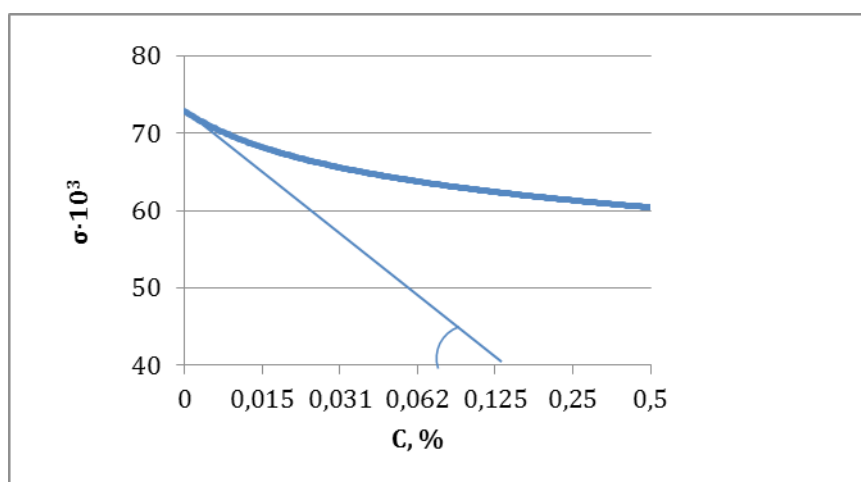
Figure 4 – Dependence of  $1/\Gamma$  from  $1/C$  for water PS solutions

Taken into consideration, the data about the densely packed molecules in a monolayer and at the limit adsorption ( $\Gamma_{\infty}$ ), we calculated the square (formula 9), occupied by one molecule, thickness (formula 10) and volume of superficial layer.

Superficial activity (g) was determined by the iso-

therm of superficial tension (fig. 5), which was calculated by the angle tangent, that was formed by a tangent line drawn to the isotherm of a superficial tension at  $C \rightarrow 0$  (formula 11).

$$\text{Then: } \operatorname{tg} \alpha = 0.213 \frac{\text{H/m}^2}{\text{kmol}}.$$



**Figure 5 – A Curve of superficial tension dependence from the balanced concentration of PS solution**

The obtained results have given the evidence of the fact that PS isolated from the solvent cake of *Tagetes patula* inflorescences belonged to a group of superficial-active substances. Due to a big section of a molecule (S) and the high average molar weight (45272 g/mol), the molecules occupy a big volume on the surface of phases border.

Ability for the micelle formation is one of the important features of SAS. Critical concentration of micelle formation (CCM) was determined by a graph, based on dependence of  $\sigma$  from  $\lg C$ .

Isotherm inflection corresponds to the beginning of spherical micelles formation. For the PS solution, CCM amounted to 0.22 g per 100 g of solution.

The presence of micelle formation implies the further study of solubilizing ability of PS in a water solution.

About the micelles structure and the nature of polymer with surface-active properties to a certain degree can be judged by thermodynamic functions of micelle formation process.

With this purpose the following was calculated: free energy ( $\Delta G_M$ ), entropy ( $\Delta S_M$ ), heating effect ( $\Delta H_M$ ) of a micelle formation process [10]. The data obtained are shown in the table 3.

**Table 3 – Thermodynamic functions of micelle formation of PS solutions in water environment ( $T = 298K$ )**

| Substance                                                        | $C_{CCM}$ , kmol/m <sup>3</sup> | $\Delta G_M$ , kJ/mol | $\Delta S_M$ , kJ/mol · K | $\Delta H_M$ , kJ/mol |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| PS from the solvent cake of <i>Tagetes patula</i> inflorescences | $5.01 \cdot 10^{-5}$            | -24.52                | $8.2 \cdot 10^{-2}$       | -0.084                |

According to the characteristics shown in the table 3, the micelle formation can be considered spontaneous ( $\Delta G_M < 0$ ) and is accompanied by an insignificant exothermic effect ( $\Delta H_M < 0$ ), which is related to a small value of a critical concentration of micelle formation. The value of micelle formation's entropy independently from the structure for the majority of surface active substances occurs within  $(4.2 \div 8.4) \cdot 10$  kJ/mol · K [11].

Calculated value of  $\Delta S_M$  occurs within this limit, which allows attribution of PS to the polymeric ampholytes. Previously determined value of pH, when polymer is in isoelectric state, proves the hypothesis. Value of pH, at which the PS molecule is in a polyampholyte state, amounted to 4.7.

The conducted studies have shown that PS, isolated from the solvent cake of *Tagetes patula* inflorescences, reduce a superficial tension of water in proportion to its concentration, exhibit micelle forming ability; process of micelle formation is spontaneous, and PS molecule is a polyampholyte.

In weak polyelectrolytes that PS belongs to, the degree of dissociation of polar groups and the charge value depend on pH. The previous experiment showed the proportionality of PS water solution resistance dependence, which was measured by a conductometric method from the concentration. In this connection, it would be interesting to study the influence of pH solution on its viscosity in order to determine the presence of the isoelectric condition (IEC) of polyelectrolyte at which it remains in the polyamphion state.

Since the PS molecule contains more carboxylic groups that are capable of dissociation, polyelectrolyte is a stronger acid than base, and its IEC must be less than 7.

We determined IES of PS in the acetate buffer solution with pH within 3.2 to 6.2 by using viscometric method. In IEC polyelectrolyte molecules are usually coiled and less hydrated, therefore relative viscosity in IES is usually at its minimum.

If polyelectrolytes are used as enterosorbents for adsorption of ions of heavy metal salts, it is necessary to consider IEC and pH of the solution. In IEC condition

the features of polymer change: swelling, solubility, electric conductivity, solutions viscosity, etc. usually decrease. It must be noted during the development of the technological schemes for practical use of polymers.

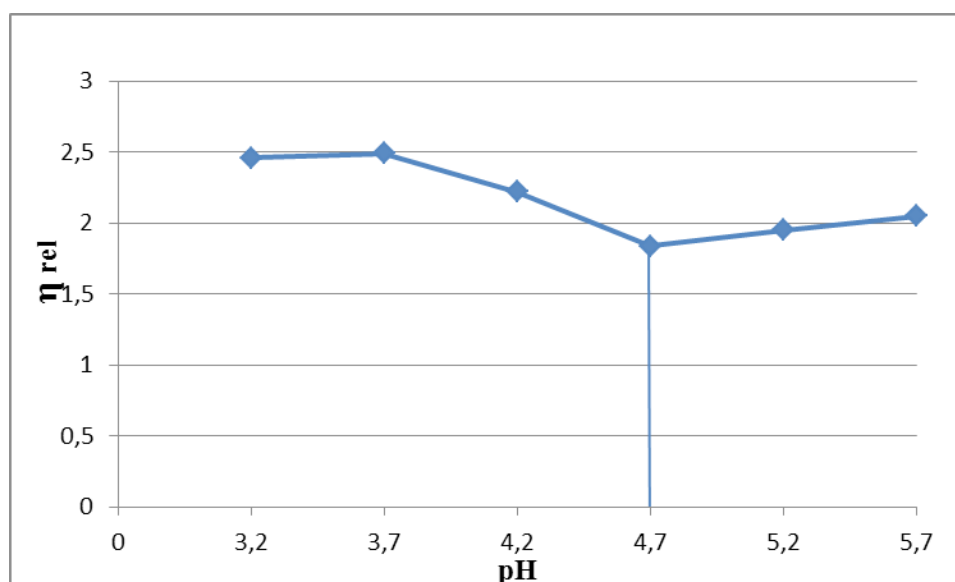
To determine IES, we prepared 1% water solution of

PS and solutions of acetate buffer with different value of pH. To 10 ml of buffer solution we added with 5 ml of PS solution, mixed and measured the time of flow out of equal volume of liquid on viscometer. The result could to be seen in table 4.

**Table 4 – Dependence of the PS solution flow out time from pH environment**

| No | pH  | t, sec | H <sub>rel</sub> |
|----|-----|--------|------------------|
| 1  |     | 27.82  |                  |
| 2  | 3.2 | 62.46  | 2.46             |
| 3  | 3.7 | 69.33  | 2.49             |
| 4  | 4.2 | 61.87  | 2.22             |
| 5  | 4.7 | 51.14  | 1.84             |
| 6  | 5.2 | 54.33  | 1.95             |
| 7  | 5.7 | 56.98  | 2.05             |

Graphic dependence of  $\eta_{rel}$  from pH (figure 6) showed that PS macromolecule remains in IEC at pH = 4.7.



**Figure 6 – Dependence of the relative viscosity of 1% PS solution from pH environment**

Consequently, due to a small volume of a macromolecule coil, there will be less difficulty for the liquid flow out, which leads to a minimum relative viscosity. Solution viscosity rises with the increase as well as the decrease of pH, because macromolecules uncoil, and their volume rises. As it is seen in the figure, that at low value of pH = 3.2, molecular coil firms up again due to suppression of ionization of positively alike charged ionogenic groups; and viscosity declines again.

Value of IES polyelectrolyte allows influencing such processes as swelling, gelling, Donnan membrane

equilibrium, and etc, that creates conditions for the right choice of one or another technological process or influences the velocity of a physiological process.

**Conclusion.** In the result of the studies using viscometer method, we have determined a molar weight of PS equal to 45272 g/mol. Huggins constant (1.46) which is connected to a low solubility of PS in water has been determined. We have established that PS, isolated from the solvent cake of *Tagetes patula*, are surface active. We have shown that PS macromolecule is in the state of polyamphion at pH = 4.7.

## Библиографический список

1. Ломкина Е.М., Червонная Н.М., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А., Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Тюренков И.Н. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА БАРХАТЦЕВ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ // *Фармация*. 2016. Т. 65. №3. С. 53–56.
2. Червонная Н.М., Андреева О.А. ОБ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СПИРТО-ВОДНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ ЦВЕТКОВ БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. №2 (часть 3). URL: [www.science-education.ru/ru/article/view?id=23713](http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23713) (дата обращения 17.04.2017).
3. Карпович Н.С., Донченко Л.В., Нелина В.В. Пектин. Производство и применение. Киев: Урожай, 1989. 88 с.
4. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А., Усов А.И., Чижов О.С., Шibaев В.Н.. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 672 с.
5. Sinner M., Puls J.J. THE CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF POLYSACCHARIDES // *Chromatography*. 1978. Vol. 156. P.194–204.
6. Мыкоц Л.П., Богдашев Н.Н., Туховская Н.А. Изучение влияния температуры на свойства пектина из стеблей льна // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. Пятигорск*, 2008. Вып. 63. С. 309–310.
7. Селина И.И., Пеливанова С.Л., Андреева О.А., Лигай Л.В., Мыкоц Л.П., Оганесян Э.Т. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕКТИНОВ И ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ КРЫЖОВНИКА ОТКЛОНЕННОГО (*GROSSULARIA RECLINATA* (L.) MILL.), ЛИСТЬЕВ ШЕЛКОВИЦЫ ЧЕРНОЙ (*MORUS NIGRA* L.) И ШЕЛКОВИЦЫ БЕЛОЙ (*MORUS ALBA* L.) // *Вопросы биологич., мед. и фармац. химии*. 2013. №10. С. 20–25.
8. Шукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. М.: Высш. шк., 2006. 444 с.
9. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. Наука, 1964. 720 с.
10. Абрамзон А.А. Поверхностно-активные вещества: Свойства и применение. Л.: Химия, 1981. 304 с.
11. Мыкоц Л.П., Богдашев Н.Н., Нерсисян З.М., Савельева Т.А. Определение параметров адсорбционного слоя, образованного природным высокомолекулярным соединением на границе раздела фаз «раствор-воздух» // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. тр. Пятигорск*, 2009. Вып. 64. С. 194–196.

## References

1. Lomkina E.M., Chervonnaya N.M., Kurkin D.V., Volotova E.V., Bakulin D.A., Oganessian E.T., Andreeva O.A., Turenkov I.N. VLIYANIE EKSTRAKTA BARKHATTSEV NA ZAZHIVLENIE RAN PRI SAKHARNOM DIABETE [INFLUENCE OF THE TAGETES PATULA EXTRACT ON THE WOUND HEALING AT DIABETES]. *Farmatsiia [Pharmacy]*. 2016. Vol. 65. No. 3. P. 53-56. (In Russ.)
2. Chervonnaya N.M., Andreeva O.A. OB ANTIOKSIDANTNOI AKTIVNOSTI SPIRTO-VODNYKH IZVLECHENII IZ TSVETKOV BARKHATTSEV RASPROSTERTYKH [ABOUT THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ALCOHOL-WATER EXTRACTS FROM THE TAGETES PATULA INFLORESCENCES]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniia [Contemporary problems of science and education]*. 2015. No. 2 (part 3). URL: [www.science-education.ru/ru/article/view?id=23713](http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23713) (access data: 17.04.2017). (In Russ.)
3. Karpovich N.S., Donchenko L.V., Nelina V.V. Pektin. Proizvodstvo i primeneniye [Pectin. Production and application]. Kiev: Urozhay, 1989. p. 88. (In Russ.)
4. Kochetkov N.K., Bochkov A.F., Dmitriev B.A., Usov A.I., Chijov O.S., Shibaev V.N. Khimiya uglevodov [Chemistry of carbohydrates]. Moskva: Himiya [Moscow: Chemistry], 1967. p. 672. (In Russ.)
5. Sinner M., Puls J.J. THE CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF POLYSACCHARIDES. *Chromatography*. 1978. Vol.156. P.194–204.
6. Mykots L.P., Bogdashev N.N., Tuhovskaya N.A. Izuchenie vlianiia temperatury na svoistva pektina iz stebel' l'na [Study for the influence of a temperature on pectin properties from Linum seeds]. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoi farmatsevticheskoi produktsii [Development, study, and marketing of new pharmaceutical products: Collected papers]*. Pyatigorsk, 2008. Vol 63. P. 309 – 310. (In Russ.)
7. Selina I.I., Pelivanova S.L., Andreeva O.A., Ligai L.V., Mykots L.P., Oganecyn E.T. FIZIKO-KHIMICHESKIE KHAARAKTERISTIKI PEKTINOV I VODORASTVORIMYKH POLISAKHARIDOV KRYZHOVNIKA OTKLONENNOGO (*GROSSULARIA RECLINATA* (L.) MILL.), LIST'EV SHELKOVITSY CHERNOI (*MORUS NIGRA* L.) I SHELKOVITSY BELOI (*MORUS ALBA* L.) [PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF PECTINS AND WATER SOLUBLE POLYSACCHARIDES OF *GROSSULARIA RECLINATA* (L.) MILL., LEAVES OF *MORUS NIGRA* L., AND *MORUS ALBA* L.] *Voprosy biologicheskoi, medicinskoi i farmatsevticheskoi himii [Problems of biological, medical, and pharmaceutical chemistry]*. 2013. No. 10. P. 20–25. (In Russ.)
8. Schukin E.D., Pertsev A.V., Amalina E.A. Kolloidnaya himiya [Colloidal chemistry]. Moskva: Vicshey shkola [Moscow: Higher school], 2006. P. 444. (In Russ.)
9. Tsvetkov V.N., Eskin V.E., Frenkel S.Y. Struktura makromolekul v rastvorakh [Structure of macromolecules in solutions]. Moskva: Nauka [Moscow: Science], 1964. P. 720. (In Russ.)
10. Abramzon A.A. Poverkhnostno-aktivnye veshchestva. Svoistva i primeneniye [Surface-active substance. Properties and application]. Leningrad: Himiy [Leningrad: Chemistry], 1981. 304 c. (In Russ.)
11. Mykots L.P., Bogdashev N.N., Nersesyan Z.M., Savelyeva T.A. Opredelenie parametrov adsorbtsionnogo sloia, obrazovannogo prirodnyy vysokomolekuliarnym soedineniem na granitse razdela faz «rastvor-vozdukh» [Determination of parameters of adsorption layer, formed by the natural high-molecular compounds at the border of phases “solution-air”]. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoi farmatsevticheskoi produktsii [Development, study, and marketing of new pharmaceutical products: Collected papers]*. Pyatigorsk, 2009. Vol. 64. P. 194-196. (In Russ.)

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Авторы:**

**Червонная Надежда Михайловна** – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

**Харченко Ирина Ивановна** – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: irinselina@yandex.ru

**Адзиахметова Симиλλα Леонтьевна** – преподаватель кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: similla503@mail.ru

**Мыкоц Лилия Петровна** – доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: физико-химические свойства природных соединений. E-mail: 58041@mail.ru

**Андреева Ольга Андреевна** – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений. E-mail: oa\_51934@yandex.ru

**Оганесян Эдуард Тоникович** – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: химия природных соединений и их синтетических аналогов, исследование промышленных отходов пищевого и фармацевтического производства как дополнительного источника получения лечебно-профилактических средств. E-mail: edwardov@mail.ru

**Autors:**

**Chervonnaya Nadezhda Mikhaylovna** – postgraduate student of the Chair of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

**Kharchenko Irina Ivanovna** – postgraduate student of the Chair of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: irinselina@yandex.ru

**Adzhiakhmetova Similla Leontievna** – lecturer of the Chair of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: similla503@mail.ru

**Mykots Liliya Petrovna** – Associate Professor of the Chair of Inorganic Chemistry at Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: physical and chemical properties. E-mail: 58041@mail.ru

**Andreeva Olga Andreevna** – Candidate of Sciences (Chemistry), Associate Professor of the Chair of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: chemistry of natural compounds. E-mail: oa\_51934@yandex.ru

**Oganesyan Eduard Tonikovich** – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Head of the Chair of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University. Research interests: chemistry of natural compounds and their synthetic analogues, study for the industrial wastes of food and pharmaceutical production, as additional source for the treatment and preventive drugs obtainment. E-mail: edwardov@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.04.2017

Принята к печати: 10.05.2017

Received: 15.04.2017

Accepted for publication: 10.05.2017

УДК: 615.212.4:615.276:547.576:616.342:612.08

## ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ АНТИУЛЬЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТОВ ВАНИЛОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TRPV1) НА МОДЕЛИ ГАСТРОПАТИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

**Ф.В. Гладких**

Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии имени С.П. Григорьева  
Национальной академии медицинских наук Украины»  
61024, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, 82  
E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Тенденция роста числа пациентов с коморбидными заболеваниями сердечно-сосудистой и опорно-двигательной систем обуславливает широкое применение в клинической практике нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), в том числе ацетилсалициловой кислотой (АСК) – одного из наиболее эффективных дезагрегантов. Однако применение лекарственных средств данной фармакологической группы существенно ограничено риском развития нежелательных реакций, особое место среди которых занимает ulcerogenic action на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). **Цель исследования.** Охарактеризовать механизмы антиульцерогенного действия агониста TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) ванилина на модели субхронической АСК-индуцированной гастропатии у крыс. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 35 половозрелых нелинейных крысах-самцах, которых содержали в условиях вивария ГУ «ИМП им. С.П. Григорьева НАМН Украины». Гастропатию, индуцированную АСК, моделировали по стандартной методике, путем внутривидеостомального (в/ж) введения посредством орогастрального зонда суспензии АСК 150 мг/кг/день в течение 5 дней. Омепразол (50 мг/кг, в/ж) и ванилин (100 мг/кг, в/ж) вводили в виде суспензий за 60 мин до АСК. Дозы препаратов были заимствованы из литературных источников. В гомогенатах слизистой оболочки желудка (СОЖ) определяли концентрацию малонового диальдегида и активность каталазы. По соотношению активности каталазы (мкат/кг) и концентрации малонового диальдегида (МДА, мкмоль/кг) рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс (АПИ). Содержание метаболитов NO в тканях желудка определяли по методике Miranda К.М. и соавт. **Результаты и обсуждение.** Превентивно-профилактическое применение ванилина (100 мг/кг) приводит к снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов в СОЖ, обусловленных действием АСК (150 мг/кг). На это указывало статистически достоверное ( $p \leq 0,05$ ) уменьшение содержания МДА на 26,4% и повышение активности каталазы на 29,0% относительно показателей животных с АСК-индуцированной гастропатией без коррекции. Также применение ванилина привело к статистически достоверному ( $p \leq 0,05$ ) повышению содержания метаболитов NO на 68,0% ( $841,4 \pm 35,95$  мкмоль/г) относительно показателей животных контрольной группы. При комбинированном применении ванилина и омепразола была установлена статистически достоверная ( $p \leq 0,05$ ) абсолютная нормализация уровня метаболитов NO ( $927,4 \pm 34,78$  мкмоль/г) в СОЖ, который соответствовал показателям интактных животных. **Заключение.** Проведенное исследование показало, что активация ванилоидных (капсаициновых) рецепторов вследствие применения TRPV1-агонистов, в частности ванилина, способна снижать ульцерогенное действие НПВП, в том числе АСК, что позволяет рассматривать агонисты TRPV1 как новый класс гастропротективных препаратов.

**Ключевые слова:** ванилоидные рецепторы, гастротоксичность, ванилин, ацетилсалициловая кислота, ульцерогенность, оксид азота

### Для цитирования:

Гладких Ф.В.  
«ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМОВ  
АНТИУЛЬЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ  
АГОНИСТОВ ВАНИЛОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TRPV1)  
НА МОДЕЛИ ГАСТРОПАТИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ  
АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ».  
Фармация и фармакология. 2017;5(3):283-301.  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-283-301

© Гладких Ф.В., 2017

### For citation:

Hladkykh F.V.  
“CHARACTERISTIC OF MECHANISMS  
OF ANTIULCEROGENIC ACTION OF AGENTS  
OF VANILLOID RECEPTORS (TRPV1)  
ON THE MODEL OF GASTROPATHY INDUCED  
BY ACETYLSALICYLIC ACID”.  
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(3):283-301. (In Russ.)  
DOI:10.19163/2307-9266-2017-5-3-283-301

## CHARACTERISTIC OF MECHANISMS OF ANTIULCEROGENIC ACTION OF AGENTS OF VANILLOID RECEPTORS (TRPV1) ON THE MODEL OF GASTROPATHY INDUCED BY ACETYLSALICYLIC ACID

*F.V. Hladkykh*

State institution «Grigoriev Institute for medical Radiology  
The National Academy of Medical Sciences of Ukraine»  
82, Pushkinska str., Kharkiv, 61024, Ukraine  
E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

One of the main problems of the use of acetylsalicylic acid (ASA) is its withdrawal or initial “non-prescription” resulted from the prior developed or potential side effects in the gastrointestinal tract. In this case, the reasons for the abolition of ASA are not only serious complications in the form of gastrointestinal bleeding or perforations, but also dyspeptic phenomena that are accompanied by the ongoing development of aspirin-induced gastroenteropathy. **The aim of the study.** To characterize the mechanisms of antiulcerogenic action of agonist TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) vanillin (100 mg/kg) on the model of subchronic ASA-induced gastropathy in rats. **Materials and methods.** The study was performed on 35 mature male rats. Gastropathy induced by ASA was simulated by a five-day intragastric (i.g.) introduction via the orogastric probe of an ASA suspension of 150 mg/kg/ day during 5 days. Omeprazole (50 mg/kg, i.g.) and vanillin (100 mg/kg, i.g.) were administered in the form of suspensions 60 minutes prior to the use of ASA. The concentration of malonic dialdehyde, and the activity of catalase were determined in the homogenates of gastric mucosa. The prooxidant/antioxidant ratio (ProAntidex) was calculated based on the ratio of catalase activity (mcatal/kg) and the concentration of malondialdehyde (MDA concentration (umol/kg). The content of NO metabolites in the stomach tissues was determined by the method of Miranda K.M. et al. **Results and discussion.** Preventive prophylactic use of vanillin (100 mg/kg) leads to the decrease in the intensity of processes of lipid peroxidation in the gastric mucosa caused by the action of ASA (150 mg/kg). This was indicated by a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) decrease of 26.4% in MDA content and an increase in catalase activity by 29.0% relatively to those animals with ASA-induced gastropathy without correction. Also, the use of vanillin resulted in a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) increase in the content of NO metabolites by 68.0% ( $841.4 \pm 35.95$  umol / g) relatively to the animals of the control group. With the combined use of vanillin and omeprazole, a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) absolute normalization of the NO metabolite level ( $927.4 \pm 34.78$  mmol/g) in the gastric mucosa was established, which corresponded to the indices of intact animals. **Conclusion.** The study showed that the activation of vanilloid (capsaicinoid) receptors due to the use of TRPV1 agonist, in particular vanillin, can reduce deistvie ulcerogenic NSAID, including ASA, that allows to consider the TRPV1 agonists as a new class gastroprotective drugs.

**Keywords:** vanillin, acetylsalicylic acid, ulcerogenicity, nitric oxide

**Введение.** На протяжении последних 100 лет ацетилсалициловая кислота (АСК) остается одним из наиболее эффективных антитромбоцитарных препаратов первичной и вторичной профилактики атеротромбоза у пациентов с различной патологией, включая острый коронарный синдром с подъемом и без подъема сегмента ST на ЭКГ, хроническую стабильную стенокардию, ишемический инсульт, периферический атеросклероз и др., и снижает суммарную частоту инфаркта миокарда (ИМ), инсульта и сердечно-сосудистой смерти в среднем на 23,0% [1-3].

Одной из основных проблем терапии АСК (рис. 1(а)) является её отмена или исходное «неназначение» в связи с развившимися или потенциальными побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). При этом причинами отмены АСК служат не только серьезные осложнения в виде желудочно-кишечных кровотечений или перфораций, но и просто диспепсические явления на фоне развития аспирина-индуцированных гастроэнтеропатий. Неблагоприятные последствия отмены АСК хорошо известны: в случае прерывания приема препарата хотя бы на 10 дней у пациентов, получающих

его с целью вторичной профилактики нарушений мозгового кровообращения, риск этого осложнения увеличивается в 3 раза, а у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) риск ИМ возрастает в 2 раза. Более того, даже отмена АСК на 8 недель после язвенного кровотечения у пациентов, получающих антиагрегантную терапию ИБС и цереброваскулярных заболеваний, ассоциируется со значительным увеличением общей смертности [1, 4].

На сегодняшний день самым доступным способом, позволяющим снизить риск желудочно-кишечных осложнений, остается прием АСК в минимально эффективной дозе, не превышающей 75–81 мг/сут., однако такой подход не гарантирует абсолютной ЖКТ-безопасности терапии. Это обуславливает необходимость профилактического назначения гастропротекторных препаратов [1, 5].

В настоящее время основными препаратами в лечении и профилактике гастропатий, индуцированных нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС), в частности АСК, являются ингибиторы протонной помпы (ИПП). Препараты этой группы по эффективности превосходят блокаторы  $H_2$ -гистамино-

вых рецепторов и синтетические простагландины (Pg) [5, 6]. Однако, продолжительный приём ИПП может приводить к развитию мальабсорбции определенных веществ с последующим их дефицитом (витамины:  $B_{12}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), уменьшать эффективность клопидогрела, вызывать прогрессирование постменопаузального остеопороза, гипергастринемию, избыточный бактериальный рост, что повышает риск развития кишечных инфекций, пневмонии. Дисбактериоз, в свою очередь, способствует развитию воспалительного процесса в слизистой оболочке желудка (СОЖ) и толстой кишке, признаками которого является нарушение баланса между про- и противовоспалительными цитокинами, развитие нитрооксидативного стресса и деградации коллагеновых и неколлагеновых белков слизи с последующим разрушением слизистого барьера и, как следствие, нарушение резистентности и снижение интенсивности регенераторных процессов [7-10].

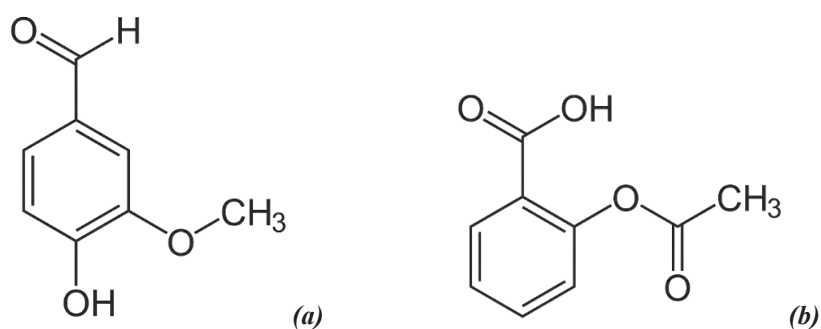
На протяжении последних лет идет активный поиск эффективных подходов к ослаблению ulcerогенности НПВС. Было предложено использование комбинированных препаратов «НПВС + гастропротектор» – индотрил (индометацин + тиотриазолин), диклокор (диклофенак + кверцетин), артротек (диклофенак натрия + мизопростол), дуэксис (ибупрофен + фамотидин), вимово (напроксен + эзомепразол), аксорид (кетопрофен + омепразол), тивоаспекард (тиотриазолин + АСК), аспифат (АСК + сукральфат), Алка-Зельцер® (АСК + натрия бикарбонат) и др. [5, 11, 12].

Привлекает внимание, появившийся в недавнем времени на отечественном рынке, модифицированный НПВС амтолметина гуацил (таб. «Амтолметин®» 600 мг, UA/12159/01/01, Д-р Реддис Лабораторис ЛТД, Индия), особенностью которого является его взаимодействие с рецепторами, которые способны связываться с гомованил-замещенными лиган-

дами (ванилоидами) и селективно модулировать локальную «эффекторную функцию» первичных афферентов. Эти рецепторы получили название ванилоидные (капсаициновые) рецепторы (*vanilloid receptor*) и принадлежат к суперсемейству TRP (*transient receptor potential*) катионных каналов и образуют в совокупности одно из шести суперсемейств – TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*). Взаимодействие амтолметила гуацила с TRPV1 СОЖ (до попадания в системный кровоток) сопровождается индукцией каскада биохимических превращений, которые активируют NO-синтазы, снижают стимулированную продукцию HCl, подавляют перекисное окисление липидов (ПОЛ) и др. [13].

По данным литературных источников [14, 15] TRPV1 локализуется на чувствительных нейронах системы блуждающего нерва (*n. vagus*) и тройничного нерва (*n. trigeminus*), в симпатических нервных сплетениях кишечника, мочевого пузыря, в некоторых структурах центральной нервной системы (*corpus striatum*, гиппокамп, ядра мозжечка), а также эпителиоцитах кишечника и мочевого пузыря и др. [16, 17]. Как известно, нервные сплетения желудка почти на 90-100% представлены синаптическими окончаниями преганглионарных волокон *n. vagus* [7, 14]. Концепция «эффекторной функции» афферентных окончаний и сведения о наличии у определенной части чувствительных терминалей *n. vagus* везикул, содержащих нейропептиды, такие как субстанция Р (SP), кальцитонин-ген родственный пептид (CGRP) и др., позволяет рассматривать модуляцию активности афферентных окончаний как перспективный подход к гастропротективной терапии [7, 18].

К числу специфических активаторов (агонистов) TRPV1 принадлежат ванилин (рис. 1 (b)), капсаицин, гингерол, зингерол, алицин, анандамид и др. [7, 19].



**Рисунок 1 – Структурные химические формулы ацетилсалициловой кислоты (2-ацетилоксибензойная кислота (a)) и ванилина (4-гидрокси-3-метоксибензальдегид (b))**

Osama A. Shakim Omar и соавт. (2013) экспериментально установили, что водный экстракт (300 мг/кг) красного перца (*Capsicum frutescens*), содержащий капсаицин, способен уменьшать площадь поврежденный СОЖ у крыс, вызванных применением АСК (200 мг/кг) на 71,1%, а также приводит к снижению объема желудочного сока на 50,7% и повышению pH на 21,8% относительно монотерапии АСК [20, 21].

Стоит отметить, что агонист TRPV1 капсаицин не только не ослабляет антиагрегантных свойств АСК, но и способен ингибировать АДФ-индуцированную (10 ммоль/л) агрегацию тромбоцитов, что указывает на целесообразность комбинированного применения АСК и капсаицина [21].

Результаты исследований М. Katary и А. Salahuddin показали, что профилактическое применение

ние ванилина (100 мг/кг) приводит к ослаблению степени изъязвления СОЖ, вызванного индометацином (25 мг/кг). Кроме того, ванилин уменьшал экспрессию и активность NFκB, а также вызывал снижение уровня провоспалительных цитокинов, миелопероксидазы и активности каспазы 3 в СОЖ [22].

Цель исследования. Охарактеризовать механизмы антиульцерогенного действия агониста TRPV1 ванилина (100 мг/кг) на модели субхронической АСК-индуцированной гастропатии у крыс.

Материалы и методы. Исследование проведено на 35 половозрелых нелинейных крысах-самцах массой 180-220 г, разделенных на 5 групп: I – интактные крысы (n=7); II (контроль) – крысы (n=7) с экспериментальной гастропатией, индуцированной АСК (150 мг/кг, в/ж) без коррекции; III – крысы (n=7) с АСК-индуцированной гастропатией (150 мг/кг, в/ж), которым превентивно вводили омепразол (50 мг/кг, в/ж); IV (n=7) – крысы с АСК-индуцированной гастропатией (150 мг/кг, в/ж), которым превентивно вводили ванилин (100 мг/кг, в/ж); V (n=7) – крысы с экспериментальной АСК-индуцированной гастропатией (150 мг/кг, в/ж), которым превентивно вводили ванилин (100 мг/кг, в/ж) в комбинации с омепразолом (50 мг/кг, в/ж).

Гастропатию, индуцированную АСК, моделировали путем пятидневного внутрижелудочного введения посредством орогастрального зонда суспензии АСК (таб. «Аспирин®» 500 мг, UA/4018/02/02, Байер Биттерфельд ГмбХ, Германия) 150 мг/кг/день [23]. За 24 часа до начала эксперимента животных содержали в метаболических клетках в условиях пищевой депривации со свободным доступом к воде. Интактным животным (без гастропатии) 2 р/д вводили воду *pro injectionibus* (0,2 мл/кг, в/ж), крысам контрольной группы (АСК-индуцированная гастропатия без лечения) за 60 мин до АСК вводили (в/ж) эквивалентное количество воды *pro injectionibus*.

Омепразол (таб. «Омепразол» 20 мг, UA/4310/01/01, ПАТ «Фармак», г. Киев, Украина) и ванилин (кристаллический порошок «Ванилин» 2,0 г (ГОСТ 16599-71, ТУ У 10,8-015533439-007:2015); ПАО «Укроптбакалия», г. Чернигов, Украина) вводили в виде суспензий за 60 мин до АСК. Дозы омепразола (50 мг/кг, в/ж) и ванилина (100 мг/кг, в/ж) были заимствованы из литературных источников [22, 24, 25].

Для приготовления суспензий АСК, омепразола и ванилина применяли эмульгатор полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат (Tween-80) и воду *pro injectionibus* (амп. 5 мл, UA/10078/01/01, ОАО «Галичфарм», г. Львов, Украина ОАО «Киевмедпрепарат», г. Киев, Украина).

На 5 день эксперимента через 6 часов после последнего введения АСК животных выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под легким эфирным наркозом. После экстирпации желудок вскрывали по большой кривизне и оценивали состояние его слизистой оболочки, степень де-

структивного поражения (количество кровоизлияний и эрозий на одно животное) и индекс Паулса (ИП) – интегральный показатель масштабов деструкции в желудке, определяемый по формуле [24, 25]:

ИП = среднее кол-во язв на 1 животное × кол-во крыс с язвами (%) / 100.

$$IP = \text{average number of ulcers per 1 animal} \times \text{number of rats with ulcers (\%)} / 100.$$

В гомогенатах СОЖ определяли концентрацию малонового диальдегида и активность каталазы [26, 27]. По соотношению активности каталазы (мкат/кг) и концентрации МДА (мкмоль/кг) рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс (АПИ) [28, 30].

Содержание метаболитов NO в тканях желудка определяли по методике Miranda К.М. и соавт. [29]. Гомогенаты СОЖ депротеинизировали в абсолютном этаноле в течении 48 часов при 4°C, после чего центрифугировали при 12000 g в течении 15 мин при 4 °C. Для восстановления нитратов до нитритов к аликвоте супернатанта добавляли хлорид ванадия (III) (VCl<sub>3</sub> 0,8% в 1M HCl) с последующим добавлением реактива Грисса (Peter Griess, 1858 г.), состоящего из дигидрохлорида N-(1-нафтил) этилендиамина (0,1%) и сульфаниламида (2,0% в 5% HCl). Инкубировали в течении 30 мин при 37 °C, после чего пробы охлаждали и измеряли оптическую плотность приготовленного раствора при 540 нм (ммоль/г ткани) [29, 30].

Животных содержали в условиях вивария ГУ «ИМП им. С.П. Григорьева НАМН Украины». В течение 14 дней крысы находились на карантине (в соответствии с санитарными нормами “Структура и содержание экспериментальных биологических клиник” (Приказ № 755 от 12.08.1997 г.)) на водно-пищевом рационе со свободным доступом к пище и воде (согласно Приложению от 04.12.1977 г. к Приказу №163 от 10.03.1996 г. «Про суточные нормы кормления лабораторных животных и продуцентов»). Все экспериментальные исследования над лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP) и с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях от 18 марта 1986 г., Директивы Европейского парламента и Совета ЕС 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей; приказ МЗ Украины от 14 декабря 2009 г. №944 «Об утверждении порядка проведения доклинического изучения лекарственных средств и экспертизы материалов доклинического изучения лекарственных средств» и Закона Украины от 21 февраля 2006 г. №3447-IV «О защите животных от жестокого обращения» [25].

Исследование взаимосвязи «молекулярная структура – биологическая активность» ванилина было проведено *in silico* с помощью PASS-анализа спектра биологической активности, который проводили в ре-

жиме *online* при непосредственном введении структурной формулы (см. рис. 1 (а)) в браузере, используя Marvin JS web-ресурса «PASS Online».

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием прикладной программы для работы с электронными таблицами «Microsoft Office Excel 2003; 2013» (*Microsoft Corporation, США*) с помощью расширения «Real Statistics» в среде Windows XP Professional (*Microsoft Corporation, США*). Оценку характера распределения величин в каждой группе выборочной совокупности проводили с использованием W-критерия Шапиро-Вилка (*Shapiro-Wilk test, n < 50*). Однородность дисперсий определяли по критерию Левена (*Levene's test*). Для оценки значимости выявленных различий исследуемых показателей при разных условиях эксперимента проводили статистический анализ с использованием параметрических и непараметрических критериев. Поскольку все исследуемые величины подчинялись закону нормального распределения (распределение Гаусса-Лапласа), достоверность различий между ними определяли попарно по t-критерию Стьюдента, который рассчитывали по формуле:

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}},$$

где M – среднее арифметическое значение.

Стандартную погрешность средней арифметической (standard error (SE), m) рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{SD}{\sqrt{n}},$$

где SD (standard deviation (SD),  $\sigma$ ) – стандартное (среднеквадратическое) отклонение и сравнивали с критическими значениями.

Полученные значения сравнивали с критическими при уровне достоверности выше 95,0% ( $p \leq 0,05$ ), выше 99,0% ( $p \leq 0,01$ ), выше 99,5% ( $p \leq 0,005$ ) и выше 99,9% ( $p \leq 0,001$ ) и делали вывод о вероятности погрешности.

Для оценки связи между переменными при условии нормального распределения величин проводили однофакторный корреляционный анализ по Пирсону (*Pearson*). По значению абсолютной величины коэффициента Пирсона ( $r$ ) характеризовали корреляционную связь по следующим критериям:  $r < 0$  – обратная связь;  $0 \leq |r| < 0,1$  – связь отсутству-

ет;  $0,1 \leq |r| < 0,3$  – слабая;  $0,3 \leq |r| < 0,7$  – умеренная;  $0,7 \leq |r| < 0,99$  – сильная;  $0,99 < |r| \leq 1$  – полная (функциональная) и указывали вероятность ошибки ( $p$ ) выявленных связей. Характер направления связи определяли в зависимости от знака коэффициента корреляции: прямая связь при положительном знаке (+) и обратная в случае отрицательного знака (–).

Цифровые данные в случае нормального распределения величин приведены в виде « $M \pm m$ » ( $M \pm SE$ ), где M – среднее арифметическое значение, m (SE) – стандартная ошибка среднего арифметического или M (95% ДИ: 5% – 95%), где 95% ДИ – 95% доверительный интервал (*Confidence interval – CI*) [25, 31].

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование показало, что пятидневное введение АСК крысам контрольной группы вызывало повреждение СОЖ в виде гиперемии, отёчности, сглаженности складок, точечных кровоизлияний и тканевых деструкций (эрозии и язвенные дефекты) у 100% животных (ИП = 12,1). Выявленные изменения указывали на формирование АСК-индуцированной гастропатии у крыс, что согласуется с данными литературы [23, 25].

Исследование гомогенатов СОЖ крыс с АСК-гастропатией без коррекции показало (табл. 1), что на 5 день эксперимента уровень МДА статистически достоверно ( $p \leq 0,001$ ) увеличился на  $132,9 \pm 22,8\%$ , а активность каталазы снизилась ( $p \leq 0,001$ ) на  $38,0 \pm 4,5\%$  относительно показателей интактных животных ( $9,7 \pm 0,35$  (95% ДИ: 9,1-10,4) мкмоль/кг и  $3,4 \pm 0,11$  (95% ДИ: 3,2-3,7) мкат/кг) и составляли соответственно  $22,3 \pm 1,76$  (95% ДИ: 18,9-25,8) мкмоль/кг и  $2,1 \pm 0,20$  (95% ДИ: 1,7-2,5) мкат/кг. Следует отметить, что между уровнем МДА и активностью каталазы имела место статистически достоверная ( $p = 0,0005$ ) сильная обратная ( $r = -0,96 \pm 0,12$ ) корреляционная связь (рис. 2).

Данные изменения привели к снижению АПИ на  $70,5 \pm 5,1\%$ , что указывало на развитие дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы в СОЖ, вызванного активацией ПОЛ.

Содержание метаболитов NO в СОЖ в условиях АСК-индуцированной гастропатии статистически достоверно ( $p \leq 0,001$ ) снизилось на  $40,5 \pm 6,3\%$  относительно показателей интактных крыс ( $902,4 \pm 34,95$  (95% ДИ: 833,9-970,9) ммоль/г) и составило  $535,7 \pm 40,65$  (95% ДИ: 446,7-605,3) ммоль/г ткани.

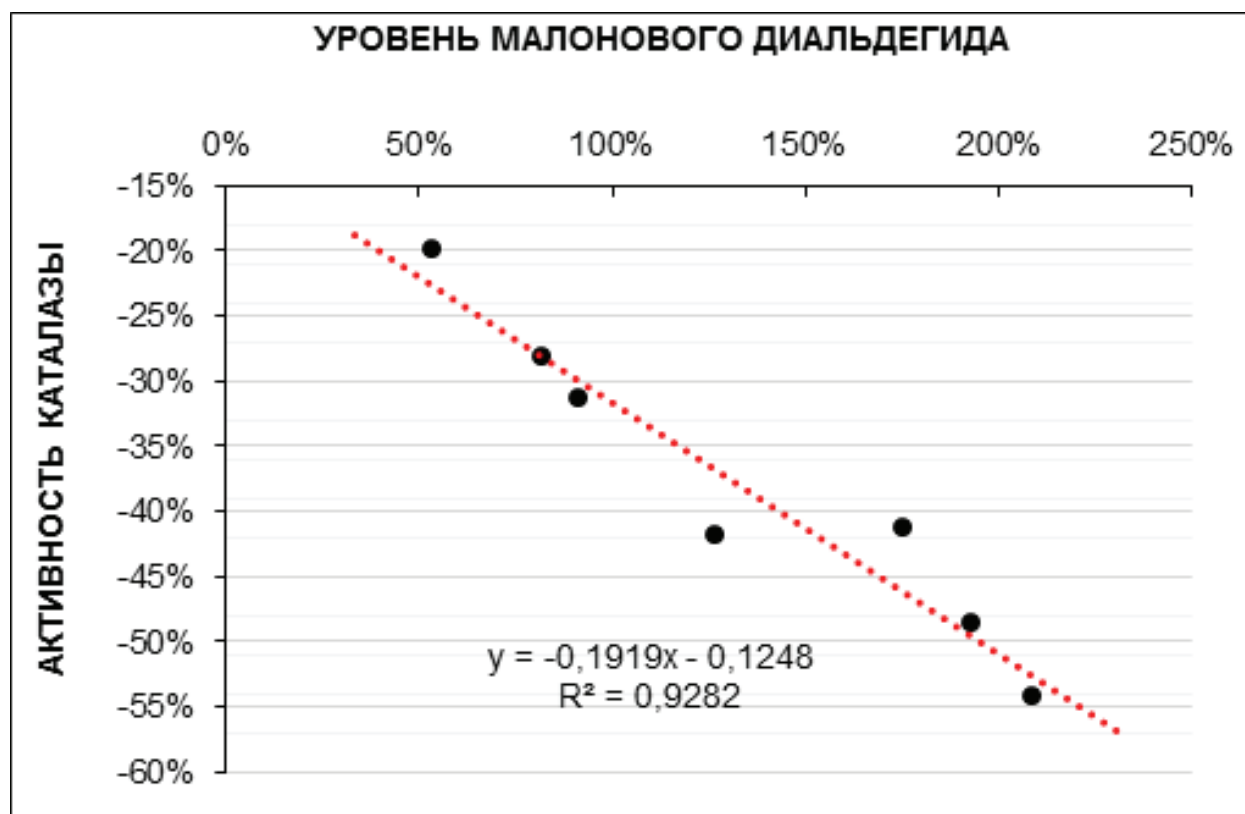


Рисунок 2 – Корреляционная связь между изменениями активности каталазы и уровнем малонового диальдегида в СОЖ крыс на фоне развития АСК-индуцированной гастропатии на 5 день эксперимента

Применение омепразола привело к значительному ослаблению ulcerогенного действия АСК (ИП = 1,4) и нивелированию оксидативного стресса с СОЖ (АПИ =  $22,0 \pm 2,93$ , что подтверждалось снижением уровня МДА на  $38,1 \pm 3,9\%$  ( $p \leq 0,01$ ) и повышением активности каталазы на  $34,9 \pm 1,5$  ( $p \leq 0,05$ ) относительно показателей животных с АСК-гастропатией без лечения. Это объясняется угнетением продукции HCl париетальными клетками желудка и, как следствие, снижением кислотности желудочного сока, который выступает ведущим повреждающим фактором в условиях снижения защитного барьера СОЖ под действием АСК. Кроме того, это согласуется с литературными данными наличия антиоксидантных свойств у омепразола [32].

Также было установлено, что содержание метаболитов NO в СОЖ на фоне применения омепразола возросло на  $35,9 \pm 8,5\%$  ( $p \leq 0,01$ ) относительно показателей животных контрольной группы ( $527,7 \pm 40,61$  (95% ДИ: 446,1-605,3) ммоль/г) и составило  $697,6 \pm 34,26$  (95% ДИ: 630,4-764,7) ммоль/г ткани.

Превентивное применение агониста TRPV1 ванилина (100 мг/кг) сопровождалось статистически достоверным ( $p \leq 0,05$ ) повышением АПИ СОЖ на  $87,9 \pm 19,7\%$  относительно аналогичного показателя у животных контрольной группы (АПИ = 9,4), что

указывало на нормализацию баланса про- и антиоксидантных процессов. По данным PASS-прогноза антиоксидантные свойства ванилина могут быть обусловлены его способностью ингибировать альдегидоксидазу ( $P_a = 0,96$ ;  $P_i = 0,002$ ), приводя тем самым к уменьшению образования активных форм кислорода и, как следствие, к снижению интенсивности ПОЛ. Кроме того, ванилин выступает прямым ингибитором ПОЛ ( $P_a = 0,7$ ;  $P_i = 0,005$ ).

Анализ результатов исследований [12-19], направленных на изучение влияния модуляторов активности TRPV1 на функциональное состояние желудочно-кишечного тракта, показал, что агонисты ванилоидных рецепторов (в частности активные компоненты жгучих специй – ванилин, капсаицин, гингерол, зингерол, изотиоционаты и др.) обладают выразительным гастропротективным действием. Активация TRPV1 приводит к экзоцитозу из С-афферентов нейропептидов (CGRP, SP, NKA, соматостатина и др.). Соматостатин, влияя на G-протеин-сопряжённые рецепторы (GPCR), приводит к снижению продукции HCl в желудке [33, 34]. Высвобождение CGRP вызывает активацию Pg-опосредованных механизмов защиты слизистой оболочки желудка – повышение продукции PgE2, который, взаимодействуя с рецепторами EP1, приводит к повышению продукции  $\text{HCO}_3^-$  (рис. 3).

**Таблица 1 – Влияние ванилина и омепразола на антиоксидантно-прооксидантный гомеостаз и содержание оксида азота в слизистой оболочке желудка крыс с гастропатией, индуцированной ацетилсалициловой кислотой ( $M \pm m$  (95% ДИ);  $n=7$ )**

| Условия эксперимента                                                                   | Малоновый диальдегид, мкмоль/кг                                                                                                 | Каталаза, мкат/кг                                                                                                       | Антиоксидантно-прооксидантный индекс                                                                                             | Содержание метаболитов NO, ммоль/г ткани                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I<br>Интактные крысы                                                                   | 9,7 ± 0,35<br>(9,1-10,4)                                                                                                        | 3,4 ± 0,12<br>(3,2-3,7)                                                                                                 | 35,0 ± 0,63<br>(33,8-36,3)                                                                                                       | 902,4 ± 34,95<br>(833,9-970,9)                                                                                                       |
| II<br>Контроль (АСК 150 мг/кг, в/ж)                                                    | 22,3 ± 1,76 ●<br>(18,9-25,8)<br>$p_1 \leq 0,001$ (+132,9±22,8%)                                                                 | 2,1 ± 0,20 ●<br>(1,7-2,5)<br>$p_1 \leq 0,001$ (-38,0±4,5%)                                                              | 10,2 ± 1,66 ●<br>(7,0-13,5)<br>$p_1 \leq 0,001$ (-70,5±5,1%)                                                                     | 525,7 ± 40,61 ●<br>(446,1-605,3)<br>$p_1 \leq 0,001$ (-40,5±6,3%)                                                                    |
| III<br>Омепразол (50 мг/кг, в/ж)<br>+ АСК (150 мг/кг, в/ж)                             | 13,5 ± 0,65 ●■<br>(12,2-14,8)<br>$p_1 \leq 0,01$ (+40,7±11,0%)<br>$p_2 \leq 0,01$ (-38,1±3,9%)                                  | 2,9 ± 0,27 ■<br>(2,3-3,4)<br>$p_1 \geq 0,05$ (-16,2±6,5%)<br>$p_2 \leq 0,05$ (+34,9±1,5%)                               | 22,0 ± 2,93 ●■<br>(16,2-27,7)<br>$p_1 \leq 0,001$ (-36,7±9,1%)<br>$p_2 \leq 0,001$ (+123,5±5,8%)                                 | 697,6 ± 34,26 ●■<br>(630,4-764,7)<br>$p_1 \leq 0,01$ (-21,6±5,9%)<br>$p_2 \leq 0,01$ (+35,9±8,5%)                                    |
| IV<br>Ванилин (100 мг/кг, в/ж)<br>+ АСК (150 мг/кг, в/ж)                               | 15,6 ± 0,68 ●■<br>(14,3-17,0)<br>$p_1 \leq 0,001$ (+60,8±9,1%)<br>$p_2 \leq 0,01$ (-26,4±8,5%)                                  | 2,7 ± 0,26 ■<br>(2,2-3,2)<br>$p_1 \leq 0,01$ (-20,1±5,9%)<br>$p_2 \geq 0,05$ (+29,0±2,1%)                               | 17,6 ± 1,46 ●■<br>(14,7-20,4)<br>$p_1 \leq 0,001$ (-49,7±4,5%)<br>$p_2 \leq 0,01$ (+87,9±19,7%)                                  | 841,4 ± 35,95 ■<br>(771,0-911,9)<br>$p_1 \geq 0,05$ (-6,2±4,7%)<br>$p_2 \leq 0,001$ (+68,0±19,1%)                                    |
| V<br>Ванилин (100 мг/кг, в/ж)<br>+ Омепразол (50 мг/кг, в/ж)<br>+ АСК (150 мг/кг, в/ж) | 11,6 ± 0,47 ●■▲<br>(10,6-12,5)<br>$p_1 \leq 0,01$ (+19,5±5,7%)<br>$p_2 \leq 0,001$ (-46,2±4,9%)<br>$p_3 \leq 0,05$ (-12,7±6,4%) | 3,1 ± 0,31 ■<br>(2,5-3,7)<br>$p_1 \geq 0,05$ (-8,4±7,3%)<br>$p_2 \leq 0,05$ (+47,3±2,6%)<br>$p_3 \geq 0,05$ (+9,2±1,3%) | 27,4 ± 2,90 ●■<br>(21,7-33,1)<br>$p_1 \leq 0,05$ (-21,3±8,9%)<br>$p_2 \leq 0,001$ (+185,0±20,3%)<br>$p_3 \geq 0,05$ (+28,8±8,5%) | 927,4 ± 34,78 ■▲<br>(859,2-995,5)<br>$p_1 \geq 0,05$ (+3,8±5,9%)<br>$p_2 \leq 0,001$ (+82,9±16,3%)<br>$p_3 \leq 0,001$ (+35,6±10,2%) |

**Примечание:** 1. ● –  $p \leq 0,05$  относительно показателей интактных животных (I);

2. ■ –  $p \leq 0,05$  относительно показателей животных контрольной группы (II);

3. ▲ –  $p \leq 0,05$  относительно показателей животных группы монотерапии омепразолом (III);

4. индексами указано номера группы сравнения.

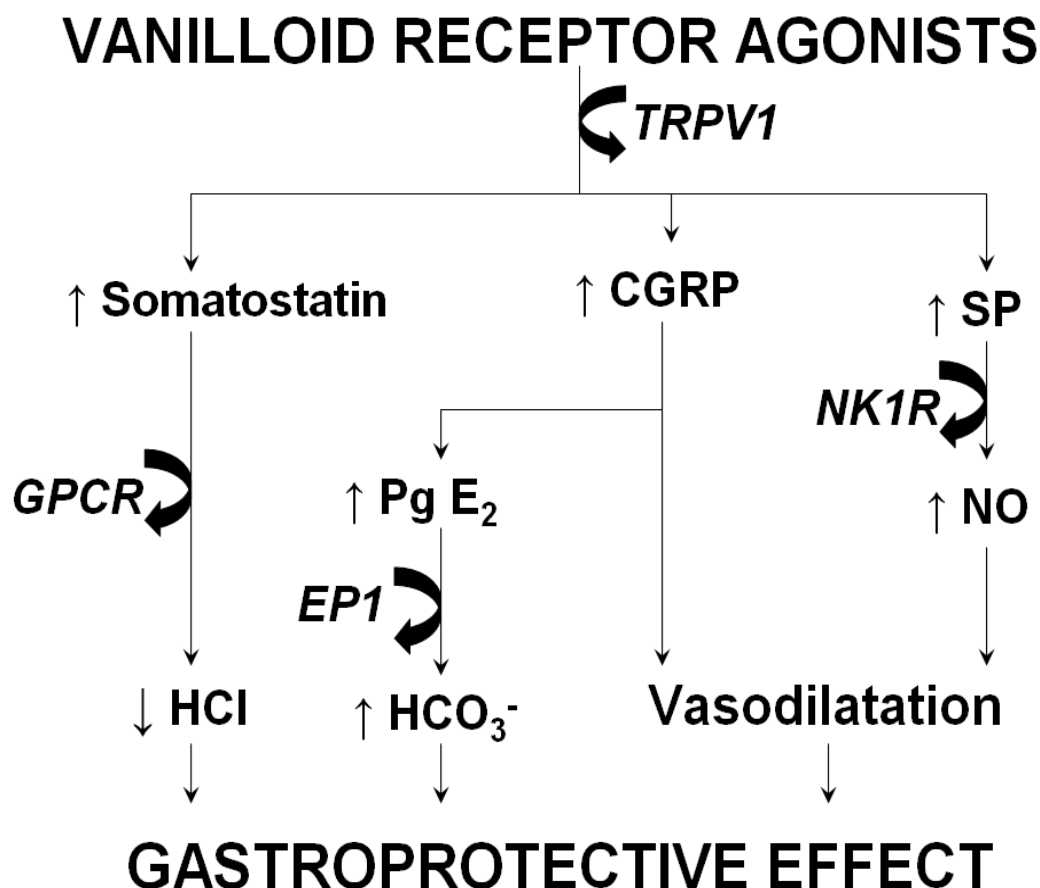


Рисунок 3 – Механизмы реализации гастропротективного действия агонистов ваниллоидных рецепторов (TRPV1) [Гладких Ф.В., 2017]

Примечания:

TRPV1 – ваниллоидные рецепторы транзитивных (переходных) потенциал-зависимых катионных каналов первого типа (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, альтернативное название: ваниллоидные рецепторы первого типа – vanilloid receptor 1 (VR1));

CGRP – кальцитонин-ген родственный пептид (calcitonin gene related peptide);

GPCR – G-белок родственные рецепторы (G protein-coupled (linked) receptors (GPLR) альтернативные названия: рецепторы с семью трансмембранными доменами – seven-transmembrane domain receptors (7TM), семиспиральные рецепторы – heptahelical receptors, серпентиновые рецепторы – serpentine receptor;

Pg E<sub>2</sub> – простагландин E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>);

EP1 – рецептор простагландина E<sub>2</sub> первого типа (Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor 1 (PTGER1))

SP – субстанция P (substance P);

NK1R – рецепторы нейрокинаина первого типа (neurokinin 1 receptor; альтернативные названия: тахикининовые рецепторы первого типа – tachykinin receptor 1 (TACR1), рецепторы к субстанции P – substance P receptor (SPR)).

Важным механизмом гастропротективного эффекта является индукция образования NO под влиянием CGRP и SP, которая взаимодействует с рецепторами нейрокинаина первого типа (NK1R). Из литературных источников [35-37] известно, что NO обладает протективным действием в отношении СО ЖКТ: повышает слизеобразование и секрецию бикарбонатов, улучшает гастроинтестинальный кровоток, ускоряет ангиогенез, снижает желудочную секрецию, блокирует адгезию нейтрофилов к эндотелию сосудов и др. Вышеуказанные свойства данного газотрансмиттера послужили основанием создания целого ряда NO-высвобождающих НПВС: NO-аспи-

рин, NO-диклофенак, NO-напроксен, NO-флупрофен, NO-кетопрофен, NO-сулиндак, NO-ибупрофен, NO-индометацин и др. [35-37].

Проведенное исследование показало, что введение ванилина привело к статистически достоверному ( $p \leq 0,001$ ) повышению на  $68,0 \pm 19,1\%$  содержания метаболитов NO в СОЖ относительно показателей животных контрольной группы с АСК-гастропатией и составляло  $841,4 \pm 35,95$  (95% ДИ: 771,0-911,9) ммоль/л, что практически сопоставлялось с показателями интактных крыс ( $902,4 \pm 34,95$  ммоль/л).

При комбинированном применении омепразола и ванилина антиульцерогенное действие (ИП = 0,8)

превосходило эффективность монотерапии омепразолом и монотерапии ванилином (см. табл. 1). Повышение АПИ на  $28,8 \pm 8,5\%$  ( $27,4 \pm 2,9$ ) превосходило показатели монотерапии омепразолом ( $22,0 \pm 2,93$ ) и практически сопоставлялось с показателями интактных животных ( $35,0 \pm 0,63$ ). Следует отметить, что на фоне комбинированного применения ванилина и омепразола было отмечено повышение содержания NO в СОЖ на  $82,9 \pm 16,3\%$  ( $p \leq 0,001$ ) относительно показателей животных контрольной группы ( $697,6 \pm 34,26$  ммоль/г) и составило  $927,4 \pm 34,78$  (95% ДИ:  $859,2-995,5$ ) ммоль/г, что незначительно ( $3,8 \pm 5,7\%$ ) превосходило показатели интактных крыс ( $902,4 \pm 34,95$  ммоль/г).

**Заключение.** Формирование АСК-индуцированной гастропатии у крыс сопровождается развитием оксидативного стресса с СОЖ. На это указывало статистически достоверное ( $p \leq 0,05$ ) повышение уровня МДА на  $132,9\%$  и коррелирующее ( $r = -0,96$ ;  $p \leq 0,05$ ) снижение активности каталазы на  $38,0\%$  в гомогенатах СОЖ на 5 день эксперимента. Также имело место снижение содержания метаболитов NO на  $40,5\%$ .

Превентивно-профилактическое применение ванилина ( $100$  мг/кг) приводит к снижению интен-

сивности процессов ПОЛ в СОЖ, обусловленных действием АСК ( $150$  мг/кг). На это указывало статистически достоверное ( $p \leq 0,05$ ) уменьшение содержания МДА на  $26,4\%$  и повышение активности каталазы на  $29,0\%$  относительно показателей животных с АСК-индуцированной гастропатией без коррекции.

Применение ванилина привело к статистически достоверному ( $p \leq 0,05$ ) повышению содержания метаболитов NO на  $68,0\%$  ( $841,4 \pm 35,95$  ммоль/г) относительно показателей животных контрольной группы. При комбинированном применении ванилина и омепразола была установлена статистически достоверная ( $p \leq 0,05$ ) абсолютная нормализация уровня метаболитов NO ( $927,4 \pm 34,78$  ммоль/г) в СОЖ, который соответствовал показателям интактных животных.

### Благодарности

Автор выражает благодарность за помощь в проведении биохимических исследований младшему научному сотруднику Государственного учреждения «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева Национальной академии медицинских наук Украины» Полозову Станиславу Дмитриевичу.

**Introduction.** Over the past hundred years, acetylsalicylic acid (ASA) remains to be one of the most effective antiplatelet drugs for primary and secondary prevention of atherothrombosis in patients with various pathologies, including acute coronary syndrome with elevation and without ST-segment elevation on the ECG, chronic stable angina, ischemic stroke, peripheral atherosclerosis, etc., and reduces the overall occurrence of myocardial infarction (MI), stroke and cardiovascular death by an average of  $23.0\%$  [1-3].

One of the main problems of ASA therapy (fig. 1 (a)) is its abolition or initial «non-assignment» in connection with the developed or potential side effects in the gastrointestinal tract (GI tract). In this case, the reasons for the abolition of ASA are not only serious complications in the form of gastrointestinal bleeding or perforations, but also dyspeptic phenomena that are accompanied by the ongoing development of aspirin-induced gastroenteropathy. The adverse consequences of withdrawal of ASA are well known: if the drug treatment of patients receiving it for the purpose of secondary prevention of cerebral circulation is interrupted for at least 10 days, the risk of this complication increases 3-fold, and in patients with coronary heart disease (CHD), the risk of myocardial infarction increases 2 times. Moreover, the abolition of ASA even for 8 weeks after the a bleeding ulcer in patients receiving antiplatelet therapy for ischemic heart disease and cerebrovascular disease, has been associated with a significant increase in overall mortality [1, 4].

Recently, the most affordable way to reduce the risk of gastrointestinal complications is the administration of ASA in a minimally effective dose that does not exceed  $75-81$  mg/day; but this approach does not guarantee an absolute safety of gastrointestinal therapy. This deter-

mines the need for the preventive administration of gastroprotective drugs [1, 5].

Currently, the main drugs used in the treatment and prevention of gastropathies induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), in particular ASA, are proton pump inhibitors (PPI). Drugs of this group are superior in efficiency to H<sub>2</sub>-histamine receptor blockers and synthetic prostaglandins (Pg) [5, 6]. However, prolonged intake of PPI could lead to the development of malabsorption of certain substances with their subsequent deficiency (vit. B<sub>12</sub>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), could reduce the effectiveness of clopidogrel, cause the progression of postmenopausal osteoporosis, hypergastrinemia, excessive bacterial growth, which increases the risk of intestinal infections, and pneumonia. Dysbacteriosis contributes to the development of the inflammatory process in the gastric mucosa and colon, with signs of of disbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, with the development of nitroso-oxidative stress and the degradation of collagen and non-collagen proteins of mucus, that is followed by destruction of the mucous barrier and, as a consequence, disruption of the resistance and the decrease of the intensity of regenerative processes [7-10].

Over the past years, there has been an active search for the effective approaches to weaken the ulcerogenicity of NSAIDs. The use of combined preparations of «NSAIDs + gastroprotector» – indotril (indomethacin + tiotriazolin), diclocor (diclofenac + quercetin), arthrotec (diclofenac sodium + misoprostol), duex (ibuprofen + famotidine), vimovo (naproxen + esomeprazole), axoride (ketoprofen + Omeprazole), thioaspecard (tiotriazoline + ASA), aspi fate (ASA + sucralfate), Alka-Seltzer® (ASA + sodium bicarbonate), etc. [5, 11, 12] was proposed.

Attention has been drawn to the recent appear-

ance on the domestic market of a modified NSAID amtolmethine guacyl (*tablets Amtolmetin® 600 mg, UA/12159/01/1, Dr. Reddis Laboratories Ltd., India*), which is characterized by its interaction with receptors which are able to bind to homovanilyl-substituted ligands (vanilloids) and selectively modulate the local «effector function» of the primary afferents. These receptors are called vanilloid receptors (*vanilloid receptors*) and belong to the superfamily TRP (*transient receptor potential*) of cation channels and form in aggregate one of six superfamilies – TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*). The interaction of ammonium methyl guacyl with TRPV1 gastric mucosa (before entering the systemic bloodstream) is accompanied by the induction of a cascade of biochemical transformations that activate NO synthases, reduce the stimulated production of HCl, and suppress lipid peroxidation (LPO), etc. [13].

According to the literature [14, 15], TRPV1 is local-

ized on the sensory neurons of the vagus nerve system (n. Vagus) and the trigeminal nerve (n. Trigemini), in the sympathetic nerve plexus of the intestine, the bladder, in the certain structures of the central nervous system (corpus striatum, Hippocampus, cerebellum nuclei), as well as epithelial cells of the intestine and bladder, etc. [16, 17]. It is known, that the nerve plexus of the stomach is almost 90-100% represented by synaptic endings of preganglionic fibers n. Vagus [7, 14]. The concept of «effector function» of afferent endings and the information about the presence of sensitive terminals in a certain part. N. Vagus vesicles containing neuropeptides, such as substance P (SP), calcitonin gene related peptide (CGRP), etc., allows to consider the modulation of afferent endings as a promising approach to gastroprotective therapy. [7, 18].

The specific TRPV1 activators (agonists) are vanillin (Figure 1 (b)), capsaicin, gingerol, singerol, allicin, anandamide, etc. [7, 19].

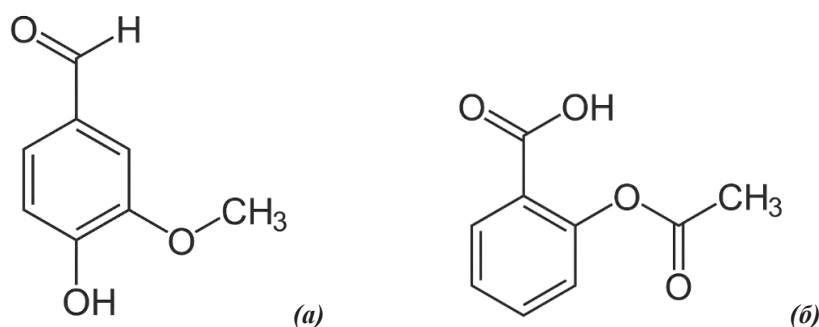


Figure 1 – Structural chemical formulas for vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (a)) and acetylsalicylic acid (2-acetoxybenzoic acid (b))

Osama A. Shakim Omar et al. (2013) experimentally found that an aqueous extract (300 mg/kg) of red pepper (*Capsicum frutescens*) which contains capsaicin, is able to reduce the area of damage to gastric mucosa in rats that was caused by the use of ASA (200 mg/kg), by 71.1%, and also leads to a decrease in the volume of the gastric juice by 50.7% and to an increase in pH by 21.8% relatively to ASA monotherapy [20, 21].

It should be noted that the TRPV1 agonist capsaicin does not only weakens the antiaggregant properties of ASA, but also is capable of inhibiting of the ADP-induced (10 mmol/l) platelet aggregation, which indicates the appropriateness of the combined use of ASA and capsaicin [21].

The results of the studies of M. Katary and A. Salahuiddin showed that the preventive use of vanillin (100 mg/kg) leads to a decrease in the degree of ulceration caused by indomethacin (25 mg/kg). Additionally, vanillin reduced the expression and activity of NFκB, and also caused a decrease in the level of proinflammatory cytokines, myeloperoxidase and in the activity of caspase 3 in the gastric mucosa [22].

**The aim of the study.** To characterize the mechanisms of antiulcerogenic action of vanillin (100 mg/kg), the agonist of TRPV1, on the model of subchronic ASA-induced gastropathy in rats.

**Materials and methods.** The study was conducted on 35 mature male rats weighting 180-220 g, divided into 5 groups: I – intact rats (n = 7); II (control) – rats (n = 7) with the experimental gastropathy induced by ASA (150 mg/kg, i.g.) without correction; III – rats (n = 7) with the ASA-induced gastropathy (150 mg/kg, i.g.), to whom omeprazole (50 mg / kg, w / w) was preventively administered; IV (n = 7) – rats with ASA-induced gastropathy (150 mg/kg, i.g.), to whom vanillin (100 mg / kg, ip) was preventively administered; V (n = 7) – rats with the experimental ASA-induced gastropathy (150 mg/kg, i.g.), to whom vanillin (100 mg/kg, i.g.) in the combination with omeprazole (50 mg/kg, i.g.) were preventively administered.

The ASA-induced gastropathy was modeled by a five-day intragastric administration via a orogastric probe of the ASA suspension (*table «Aspirin®» 500mg, UA/4018/02/02, Bayer Bitterfeld GmbH, Germany*) 150 mg/kg/day [23]. 24 hours before the start of the experiment, the animals were kept in the metabolic cells under the conditions of food deprivation with the free access to water. Intact animals (without gastropathy) were given water *pro injectionibus* (0.2 ml/kg, i.g.) twice a day, rats of the control group (ASA-induced gastropathy without treatment) were given an equivocal amount of water *pro injectionibus* 60 minute prior the the administration (i.g.) of ASA.

Omeprazole (tablets «Omeprazole» 20 mg, UA/4310/01/01, PAP «Farmak», Kiev, Ukraine) and vanillin (crystalline powder «Vanillin» 2.0 g (GOST 16599-71, TU U10,8-015533439-007: 2015), PJSC «Ukroptbakaliya», Chernigov, Ukraine) were introduced in the form of suspensions 60 minutes prior to the administration of ASA. The doses of omeprazole (50 mg/kg, i.g.) and vanillin (100 mg/kg, i.g.) were taken from the literature sources [22, 24, 25].

For the preparation of suspensions of ASA, omeprazole and vanillin, a polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween-80) emulsion and water *pro injectionibus* (amp. 5.0 ml, UA/10078/01/01, Halychpharm, Lviv, Ukraine «Kievmedpreparat», Kiev, Ukraine) were used.

On day 5 of the experiment, 6 hours after the last administration of ASA, the animals were withdrawn from the experiment by the dislocation of cervical vertebrae under the light ether anesthesia. After extirpation, the stomach was opened through the large curvature and the state of its mucous membrane was evaluated; the degree of destructive lesion (the number of hemorrhages and erosions per animal) and the Pauls index (IP) – the integral indicator of the extent of destruction in the stomach, was determined by the formula [24, 25]:

IP = average number of ulcers per 1 animal × number of rats with ulcers (%) / 100.

In the gastric mucosa's homogenates, the concentration of malonic dialdehyde (Stalnaya I.D. et al.) and catalase activity (Karolyuk M.A. et al.) were determined [26, 27]. The prooxidant/antioxidant ratio (ProAntidex) was calculated from the ratio of catalase activity (mcat/kg) and MDA concentration (μmol/kg) [28, 30].

The content of NO metabolites in the stomach tissues was determined by the method of Miranda K.M. Et al. [29]. The gastric mucosa's homogenates were deproteinized in the absolute ethanol for 48 hours at 4 °C and then were centrifuged at 12,000 g for 15 minutes. At 4 °C. For the reduction of nitrates to nitrites, vanadium chloride ((III) VCl<sub>3</sub> 0.8% in 1M HCl) was added to the supernatant, with the following addition of the Griess reagent (1858), consisting of N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0.1%) and sulfanilamide (2.0% in 5% HCl). After the incubation for 30 minutes at 37 °C, the samples were cooled, and the optical density of the prepared solution was measured at 540 nm (mmol/g tissue) [29, 30].

The animals were kept in a vivarium of the State Institution «Grigoriev Institute for Medical Radiology The National Academy of Medical Sciences of Ukraine». Within 14 days the rats were quarantined (in accordance with the sanitary norms «Structure and content of experimental biological clinics» (Order No. 755 of 12.08.1997)) on a water-food diet with the free access to food and water (according to the Appendix from 04.12.1977 to Order No. 163 of 10.03.1996 «On daily feeding norms for laboratory animals and producers»). All experimental studies on laboratory animals were conducted in accordance with the requirements of the good laboratory practice (GLP) and in

compliance with the main provisions of the Council of European Convention on the Protection of Vertebrates which are used in experiments and for other scientific purposes of March 18, 1986, the Directive of the European Parliament and Council EU 2010/63 / EC of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes; The order of the Ministry of Health of Ukraine from December 14, 2009, No. 944 «On approval of the procedure for preclinical study of medicinal products and examination of materials for preclinical study of medicinal products» and the Law of Ukraine of February 21, 2006 No. 3447-IV «On the protection of animals from cruel treatment» 25].

An investigation of the interrelation of «molecular structure-biological activity» of vanillin was carried out *in silico* with the help of the PASS-analysis of the spectrum of biological activity, which was performed *on-line* with the direct introduction of the structural formula (see Fig. 1 (a)) in the browser using Marvin JS web -resource «PASS Online».

The Statistical interpretation of the obtained results was done with the use the application program for the spreadsheets «Microsoft Office Excel 2003; 2013 «(Microsoft Corporation, USA) with the assistance of the» Real Statistics «extension» for the Windows XP Professional environment (Microsoft Corporation, USA). The character of the distribution of the values in each group of the sample was estimated by using the Shapiro-Wilk W-test (n < 50). The homogeneity of the dispersions was determined by the Levene's test. A statistical analysis was performed using parametric and nonparametric criteria on purpose to assess the significance of the revealed differences in the studied parameters under the different experimental conditions. Since all the investigated quantities obeyed the law of normal distribution (the Gauss-Laplace distribution), the reliability of the differences between them was determined in pairs by the Student's t-criterion, which was calculated by the formula:

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}},$$

where M is the arithmetic mean.

The standard error of the arithmetic mean (standard error (SE), m) was calculated from the formula:

$$m = \frac{SD}{\sqrt{n}},$$

where SD (standard deviation (SD), σ) is the standard (standard deviation) deviation, and it was compared with the critical values.

The values obtained were compared with the critical values at a confidence level over 95.0% (p ≤ 0.05), over 99.0% (p ≤ 0.01), over 99.5% (p ≤ 0.005), and over 99.9% (P ≤ 0.001), and a conclusion about the probability of error was made.

To assess the relationship between the variables under the condition of normal distribution of values, the one-factor Pearson correlation analysis was carried out. By using the value of the absolute value of the Pearson coefficient (r), the correlation relation was characterized

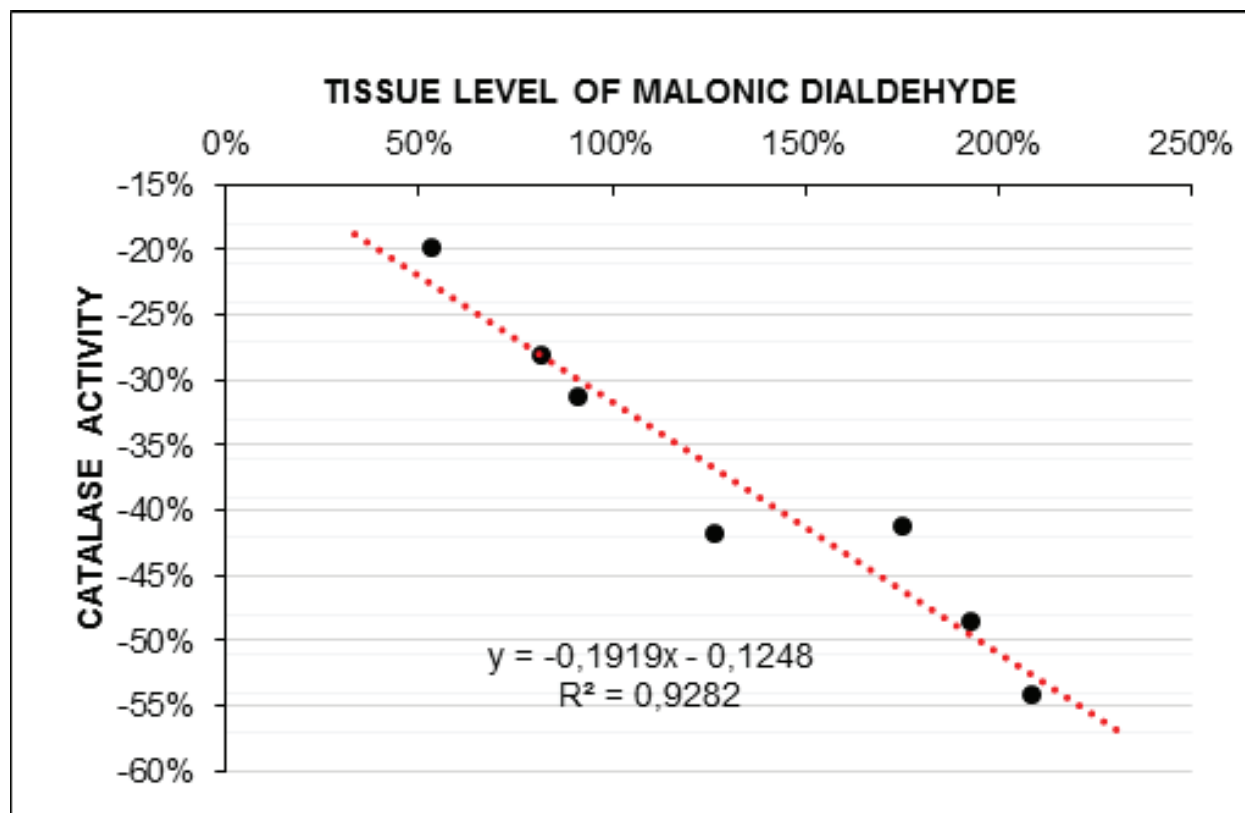
by the following criteria:  $r < 0$  – feedback;  $0 \leq |r| < 0,1$  – there is no connection;  $0,1 \leq |r| < 0,3$  – weak;  $0,3 \leq |r| < 0,7$  – moderate;  $0,7 \leq |r| < 0,99$  – strong;  $0,99 < |r| \leq 1$  – complete (functional) and indicates the probability of error (p) of the identified links. The direction of the connection was determined depending on the sign of the correlation coefficient: the direct connection with the positive sign (+) and the inverse is in the case of a negative sign (-).

Digital data in the case of a normal distribution of quantities are demonstrated in the form “ $M \pm m$ ” ( $M \pm SE$ ), where M is the arithmetic mean, m (SE) is the standard error of the arithmetic mean, or M (95% CI: 5% – 95%), where 95% CI is 95% confidence interval (Confidence interval – CI) [25, 31].

**Results and discussion.** The study showed that a five-day-administration of ASA to the rats of the control group caused damage to the gastric mucosa in the form

of hyperemia, puffiness, smoothing of folds, spot hemorrhage and the tissue destruction (erosion and ulcerative defects) in 100% of animals (PI = 12.1). The revealed changes indicated the formation of ASA-induced gastropathy in rats, which agrees with the data of the literature sources [23, 25].

The study of homogenates of the gastric mucosa with the ASA-gastropathy without correction showed (Table 1) that on the 5th day of the experiment the MDA level statistically significant ( $p \leq 0,001$ ) increased by  $132,9 \pm 22,8\%$ , and the catalase activity decreased ( $p \leq 0,001$ ) by  $38,0 \pm 4,5\%$  compared to the indices of intact animals ( $9,7 \pm 0,35$  (95% CI: 9.1-10.4)  $\mu\text{mol/kg}$  and  $3,4 \pm 0,11$  (95% CI: 3.2-3.7) mkat/kg) and were  $22,3 \pm 1,76$  (95% CI: 18.9-25.8)  $\mu\text{mol/kg}$  and  $2,1 \pm 0,20$  (95% CI: 1.7-2.5) mcat/kg. It should be noted that there was a statistically significant ( $p = 0,0005$ ) strong inverse correlation ( $r = -0,96 \pm 0,12$ ) between the MDA level and the catalase activity (fig. 2).



**Figure 2 – Correlation between the changes in the catalase activity and the level of malonic dialdehyde in the gastric mucosa on the background of development of ASA-induced gastropathy on day 5 of the experiment**

These changes led to a decrease in the ProAntidex by  $70,5 \pm 5,1\%$ , which indicated the development of an imbalance of the prooxidant-antioxidant system in the gastric mucosa, caused by the activation of LPO.

The content of NO metabolites in the gastric mucosa under conditions of ASA-induced gastropathy was statistically significant ( $p \leq 0,001$ ) decreased by  $40,5 \pm 6,3\%$  relatively to the indices of intact rats ( $902,4 \pm 34,95$  (95% CI: 833.9-970,9) mmol/g) and was  $535,7 \pm 40,65$  (95% CI: 446.7-605,3) mmol/g tissue.

The use of omeprazole led to a significant weakening of the ulcerogenic effect of ASA (PI = 1.4) and to the leveling

of oxidative stress with gastric mucosa (ProAntidex =  $22,0 \pm 2,93$ ), which was confirmed by a  $38,0 \pm 3,9\%$  decrease in the MDA level ( $p \leq 0,01$ ) and an increase in the catalase activity by  $34,9 \pm 1,5$  ( $p \leq 0,05$ ) relatively to those of animals with the ASA-gastropathy without treatment. It occurred due to the oppression of HCl production by the parietal cells of the stomach and, that brought a decrease in the acidity of gastric juice, which acts as a leading damaging factor in the conditions of the reduced protective barrier of gastric mucosa caused by the influence of ASA. In addition, it is consistent with the literature data of the antioxidant properties possessed by omeprazole [32].

*Table 1 – An effect of vanillin and omeprazole on the antioxidant-prooxidant homeostasis and the content of nitric oxide in the gastric mucosa of rats with gastropathy induced by acetylsalicylic acid ( $M \pm m$  (95% CI),  $n=7$ )*

|     | Experiment conditions                                                            | Malon dialdehyde, $\mu\text{mol/kg}$                                                                                                | Catalase, mkat/kg                                                                                                           | Prooxidant/antioxidant ratio (ProAntidex)                                                                                            | The content of metabolites NO, mmol/g tissue                                                                                             |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I   | Intact rats                                                                      | $9.7 \pm 0.35$<br>(9.1-10.4)                                                                                                        | $3.4 \pm 0.12$<br>(3.2-3.7)                                                                                                 | $35.0 \pm 0.63$<br>(33.8-36.3)                                                                                                       | $902.4 \pm 34.95$<br>(833.9-970.9)                                                                                                       |
| II  | Control (ASA 150 mg/kg, i.g.)                                                    | $22.3 \pm 1.76$ ●<br>(18.9-25.8)<br>$p_1 \leq 0.001$ (+132.9±22.8%)                                                                 | $2.1 \pm 0.20$ ●<br>(1.7-2.5)<br>$p_1 \leq 0.001$ (-38.0±4.5%)                                                              | $10.2 \pm 1.66$ ●<br>(7.0-13.5)<br>$p_1 \leq 0.001$ (-70.5±5.1%)                                                                     | $525.7 \pm 40.61$ ●<br>(446.1-605.3)<br>$p_1 \leq 0.001$ (-40.5±6.3%)                                                                    |
| III | Omeprazole (50 mg/kg, i.g.) + ASA (150 mg/kg, i.g.)                              | $13.5 \pm 0.65$ ●■<br>(12.2-14.8)<br>$p_1 \leq 0.01$ (+40.7±11.0%)<br>$p_2 \leq 0.01$ (-38.1±3.9%)                                  | $2.9 \pm 0.27$ ■<br>(2.3-3.4)<br>$p_1 \geq 0.05$ (-16.2±6.5%)<br>$p_2 \leq 0.05$ (+34.9±1.5%)                               | $22.0 \pm 2.93$ ●■<br>(16.2-27.7)<br>$p_1 \leq 0.001$ (-36.7±9.1%)<br>$p_2 \leq 0.001$ (+123.5±5.8%)                                 | $697.6 \pm 34.26$ ●■<br>(630.4-764.7)<br>$p_1 \leq 0.01$ (-21.6±5.9%)<br>$p_2 \leq 0.01$ (+35.9±8.5%)                                    |
| IV  | Vanillin (100 mg/kg, i.g.) + ASA (150 mg/kg, i.g.)                               | $15.6 \pm 0.68$ ●■<br>(14.3-17.0)<br>$p_1 \leq 0.001$ (+60.8±9.1%)<br>$p_2 \leq 0.01$ (-26.4±8.5%)                                  | $2.7 \pm 0.26$ ■<br>(2.2-3.2)<br>$p_1 \leq 0.01$ (-20.1±5.9%)<br>$p_2 \geq 0.05$ (+29.0±2.1%)                               | $17.6 \pm 1.46$ ●■<br>(14.7-20.4)<br>$p_1 \leq 0.001$ (-49.7±4.5%)<br>$p_2 \leq 0.01$ (+87.9±19.7%)                                  | $841.4 \pm 35.95$ ■<br>(771.0-911.9)<br>$p_1 \geq 0.05$ (-6.2±4.7%)<br>$p_2 \leq 0.001$ (+68.0±19.1%)                                    |
| V   | Vanillin (100 mg/kg, i.g.) + Omeprazole (50 mg/kg, i.g.) + ASA (150 mg/kg, i.g.) | $11.6 \pm 0.47$ ●■▲<br>(10.6-12.5)<br>$p_1 \leq 0.01$ (+19.5±5.7%)<br>$p_2 \leq 0.001$ (-46.2±4.9%)<br>$p_3 \leq 0.05$ (-12.7±6.4%) | $3.1 \pm 0.31$ ■<br>(2.5-3.7)<br>$p_1 \geq 0.05$ (-8.4±7.3%)<br>$p_2 \leq 0.05$ (+47.3±2.6%)<br>$p_3 \geq 0.05$ (+9.2±1.3%) | $27.4 \pm 2.90$ ●■<br>(21.7-33.1)<br>$p_1 \leq 0.05$ (-21.3±8.9%)<br>$p_2 \leq 0.001$ (+185.0±20.3%)<br>$p_3 \geq 0.05$ (+28.8±8.5%) | $927.4 \pm 34.78$ ■▲<br>(859.2-995.5)<br>$p_1 \geq 0.05$ (+3.8±5.9%)<br>$p_2 \leq 0.001$ (+82.9±16.3%)<br>$p_3 \leq 0.001$ (+35.6±10.2%) |

Notes: 1. ● –  $p \leq 0.05$  with respect to indicators of intact animals (I);

2. ■ –  $p \leq 0.05$  relatively to the animals of the control group (II);

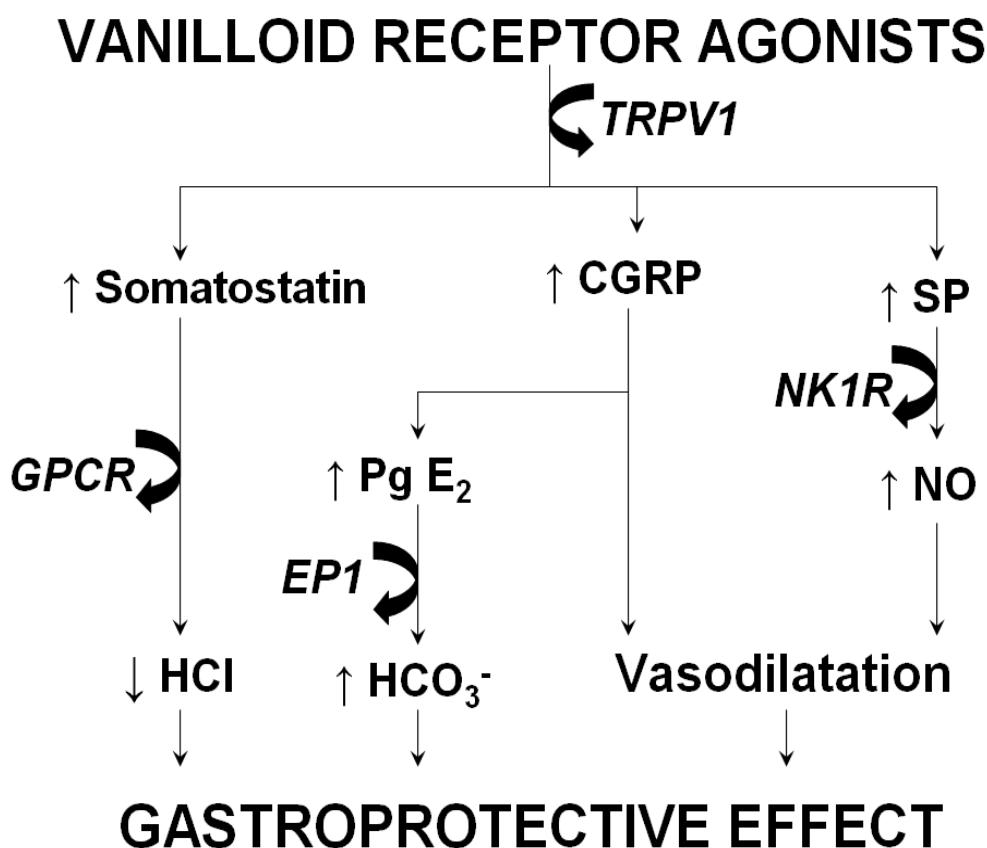
3. ▲ –  $p \leq 0.05$  relatively to the indices of animals of the monotherapy group omeprazole (III);

4. indices indicate the numbers of the comparison group.

It was also determined that the content of NO metabolites in the gastric mucosa with the use of omeprazole increased by  $35.9 \pm 8.5\%$  ( $p \leq 0.01$ ) relatively to the animals in the control group ( $527.7 \pm 40.61$  (95% CI: 446,1-605.3) mmol/g) and was  $697.6 \pm 34.26$  (95% CI: 630.4-764.7) mmol/g tissue.

The preventive use of the agonist TRPV1 vanillin (100 mg / kg) was accompanied by a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) increase in the ProAntidex of the gastric mucosa by  $87.9 \pm 19.7\%$  relatively to that of the control group (ProAntidex = 9.4), which indicated the normalization of the balance of pro- and antioxidant processes. According to the PASS-prognosis, the antioxidant properties of vanillin can be due to its ability to inhibit aldehyde oxidase ( $P_a = 0.96$ ,  $P_i = 0.002$ ), thus leading to a decrease in the formation of active oxygen forms and, as a consequence, a decrease in the LPO intensity. In addition, vanillin acts as a direct inhibitor of LPO ( $P_a = 0.7$ ,  $P_i = 0.005$ ).

An analysis of the results of studies [12-19] that had a goal to study the effect of modulators of TRPV1 activity on the functional state of the gastrointestinal tract showed that the vanilloid receptor agonists (in particular active components of burning spices – vanillin, capsaicin, gingerol, singerol, isothiocyanate, etc.) have an impressive gastroprotective effect. An activation of TRPV1 leads to exocytosis from the C-afferents of neuropeptides (CGRP, SP, NKA, somatostatin, etc.). Somatostatin by influencing G-protein-conjugated receptors (GPCR), leads to a decrease in production of HCl in the stomach [33, 34]. The release of CGRP triggers the activation of Pg-mediated mechanisms for protecting the gastric mucosa – increasing the production of PgE<sub>2</sub>, which, by interacting with the EP1 receptors, leads to an increase in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> production (fig. 3).



*Figure 3 – Mechanisms for the realization of gastroprotective action of vanilloid receptor agonists (TRPV1)*

Notes:

TRPV1 – transient receptor potential cation channel subfamily V member 1;

CGRP – calcitonin gene related peptide;

GPCR – G protein-coupled (linked) receptors (heptahelical receptors, serpentine receptor);

Pg E2 – prostaglandin E2;

EP1 – prostaglandin E2 receptor 1 (PTGER1);

SP – substance P;

NK1R – neurokinin 1 receptor (tachykinin receptor 1 (TACR1), substance P receptor (SPR)).

An important mechanism of the gastroprotective effect is the induction of NO formation under the influence of CGRP and SP, which interacts with the neurokinin receptors of the first type (NK1R). It is known from the literature sources [35-37] that NO has a protective effect on GIT: it increases the mucus formation and secretion of bicarbonates, improves gastrointestinal blood flow, accelerates angiogenesis, reduces gastric secretion, blocks adhesion of neutrophils to vascular endothelium, etc. The aforementioned properties of this gas transporter, have served as the basis for the development of a number of NO-releasing NSAIDs: NO-aspirin, NO-diclofenac, NO-naproxen, NO-flubiprofen, NO-ketoprofen, NO-sulindac, NO-ibuprofen, NO-indomethacin, etc. [35-37].

The conducted study showed that the introduction of vanillin resulted in a statistically significant ( $p \leq 0.001$ ) increase of  $68.0 \pm 19.1\%$  of the NO metabolites in the gastric mucosa relatively to those of the control group with ASA-gastropathy and was  $841.4 \pm 35.95$  (95% CI: 771.0-911.9) mmol/l, which was practically compared with the indices of intact rats ( $902.4 \pm 34.95$  mmol/g).

In the combined use of omeprazole and vanillin, the anti-ulcerogenic effect ( $PI = 0.8$ ) was superior to that of the monotherapy with omeprazole or the monotherapy with vanillin (see Table 1). The increase of IPI by  $28.8 \pm 8.5\%$  ( $27.4 \pm 2.9$ ) exceeded the indices of monotherapy with omeprazole ( $22.0 \pm 2.93$ ) and was practically compared with the parameters of intact animals ( $35.0 \pm 0.63$ ). It should be noted that against the background of the combined use of vanillin and omeprazole, an increase in the NO content of the gastric mucosa was observed at  $82.9 \pm 16.3\%$  ( $p \leq 0.001$ ) relatively to the control group animals ( $697.6 \pm 34.26$  mmol/g) and was  $927.4 \pm 34.78$  (95% CI: 859.2-995.5) mmol / g, which was in-

significantly ( $3.8 \pm 5.7\%$ ) higher than that of intact rats ( $902.4 \pm 34.95$  mmol/g).

### Conclusion:

1. The formation of ASA-induced gastropathy in rats is accompanied by the development of oxidative stress with gastric mucosa. This was indicated by the statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) increase in the MDA level by 132.9% and correlative ( $r = -0.96$ ;  $p \leq 0.05$ ) decrease in the catalase activity by 38.0% in homogenates of the gastric mucosa the 5th day of the experiment. There was also a decrease in the content of NO metabolites by 40.5%.

2. The preventive prophylactic use of vanillin (100 mg/kg) leads to a decrease in the intensity of LPO processes in the gastric mucosa caused by the action of ASA (150 mg/kg). This was indicated by a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) decrease in the MDA content by 26.4% and an increase in the catalase activity by 29.0% relatively to those of animals with the ASA-induced gastropathy without correction.

3. The use of vanillin resulted in a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) increase in the content of NO metabolites by 68.0% ( $841.4 \pm 35.95$  mmol/g) compared to the animals in the control group. With combined use of vanillin and omeprazole, a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) absolute normalization of the NO metabolite level ( $927.4 \pm 34.78$  mmol/g) in the gastric mucosa was established, that corresponded to the indices of intact animals.

**Acknowledgments.** The author expresses gratitude to Polozov Stanislav Dmytrievich, the Junior Research Scientist of the State Institution "The Institute of Medical Radiology named by S.P. Grigoryev of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" for the help in performing of the biochemical research.

### Бібліографічний список

1. Шахматова О.О., Комаров А.Л. АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВАЯ КИСЛОТА. ПОСЛЕДНИЕ НОВОСТИ О ДОЗАХ, ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ДЛИТЕЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ // *Атмосфера. Новости кардиологии*. 2011. № 3. С. 2–10.
2. Shim Y. K., Kim N. NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG AND ASPIRIN-INDUCED PEPTIC ULCER DISEASE // *Korean J. Gastroenterol.* 2016. No. 67. P. 300–312. DOI: 10.4166/kjg.2016.67.6.300
3. Baigent C., Sudlow C., Collins R., Peto R. COLLABORATIVE META ANALYSIS OF RANDOMISED TRIALS OF ANTIPLATELET THERAPY FOR PREVENTION OF DEATH, MYOCARDIAL INFARCTION, AND STROKE IN HIGH RISK PATIENTS: ANTITHROMBOTIC TRIALISTS' COLLABORATION // *British Medical Journal*. 2002. No. 324. P. 71–86. DOI: 10.1136/bmj.324.7329.71
4. Sung J.J., Lau J.Y., Ching J.Y., Wu J.C., Lee Y.T., Chiu P.W., Leung V.K., Wong V.W., Chan F.K. CONTINUATION OF LOW-DOSE ASPIRIN THERAPY IN PEPTIC ULCER BLEEDING // *Annals of Internal Medicine*. 2010. Vol. 152. No. 1. P. 1–10. DOI: 10.7326/0003-4819-152-1-201001050-00179
5. Гладких Ф. В., Степанюк Н.Г. ВІНБОРОН: ПЕРШИЙ УКРАЇНСЬКИЙ ГАСТРОПРОТЕКТОР – АГОНІСТ ВАНІЛОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ (TRPV1) // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 4–5 (50). С. 20–29. URL: [http://pharmtox-j.org.ua/webfm\\_send/523](http://pharmtox-j.org.ua/webfm_send/523)
6. Зуфаров П. С., Якубов А.В., Салаева Д.Т. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОМЕПРАЗОЛА И ПАНТОПРАЗОЛА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГАСТРОПАТИИ, ВЫЗВАННОЙ НЕСТЕРОИДНЫМИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ СРЕДСТВАМИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ // *Лікарська справа*. 2009. № 3/4. С. 44–49.
7. Гладких Ф. В., Степанюк Н.Г. СУЧАСНІ ШЛЯХИ ПОСЛАБЛЕННЯ УЛЬЦЕРОГЕННОСТІ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ: ДОСЯГНЕННЯ, НЕВИРІШЕНІ ПИТАННЯ ТА ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ // *Запорозький медичний журнал*. 2014. № 2. С. 82–86. URL: <http://zmj.zsmu.edu.ua/article/view/25437/22932>

8. Giuliano C., Wilhelm S., Kale-Pradhan P. ARE PROTON PUMP INHIBITORS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA? A META-ANALYSIS // *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* 2012. No. 5 (3). P. 337–344. DOI: 10.1586/ecp.12.20
9. Drepper M.D., Spahr L., Frossard J.L. CLOPIDOGREL AND PROTON PUMP INHIBITORS – WHERE DO WE STAND IN 2012? // *World J. Gastroenterol.* 2012. No. 18 (18). P. 2161–2171. DOI: 10.3748/wjg.v18.i18.2161
10. Bezabeh S., Mackey A.C., Kluetz P., Jappar D., Korvick J. ACCUMULATING EVIDENCE FOR A DRUG-DRUG INTERACTION BETWEEN METHOTREXATE AND PROTON PUMP INHIBITORS // *Oncologist.* 2012. No. 17 (4). P. 550–554. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0431
11. Goldstein J.L., Cryer B. GASTROINTESTINAL INJURY ASSOCIATED WITH NSAID USE: A CASE STUDY AND REVIEW OF RISK FACTORS AND PREVENTATIVE STRATEGIES // *Drug, healthcare and patient safety.* 2014. Vol. 7. P. 31–41. DOI: 10.2147/dhps.s71976
12. Pellicano R. GASTROINTESTINAL DAMAGE BY NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS: UPDATED CLINICAL CONSIDERATIONS // *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2014. No. 60 (4). P. 255–261.
13. Garg A., Shoeb A., Moodahadu Subramanya L., Sharma A., Gandhi A., Akku S. AMTOLMETIN: A REAPPRAISAL OF NSAID WITH GASTROPROTECTION // *Hindawi Publishing Corporation. Arthritis.* 2016. Vol. 2016. Article ID 7103705. P. 1–5. DOI: 10.1155/2016/7103705
14. Holzer P. LOCAL EFFECTOR FUNCTIONS OF CAPSAICIN-SENSITIVE SENSORY NERVE ENDINGS: INVOLVEMENT OF TACHYKININS, CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE AND OTHER NEUROPEPTIDES // *Neuroscience.* 1988. No. 24. P. 739–768. DOI: 10.1016/0306-4522(88)90064-4
15. Holzer P. NEURAL EMERGENCY SYSTEM IN THE STOMACH // *Gastroenterology.* 1998. No. 114. P. 823–839. DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70597-9
16. Holzer P. TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) CHANNELS AS DRUG TARGETS FOR DISEASES OF THE DIGESTIVE SYSTEM // *Pharmacol. Ther.* 2011. No. 131 (1). P. 142–170. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.006
17. Geppetti P., Trevisani M. ACTIVATION AND SENSITISATION OF THE VANILLOID RECEPTOR: ROLE IN GASTROINTESTINAL INFLAMMATION AND FUNCTION // *British Journal of Pharmacology.* 2004. No. 141. P. 1313–1320. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705768
18. Berthoud H.R., Patterson L.M., Willing A.E., Mueller K., Neuhuber W.L. CAPSAICIN-RESISTANT VAGAL AFFERENT FIBERS IN THE RAT GASTROINTESTINAL TRACT: ANATOMICAL IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL INTEGRITY // *Brain Res.* 1997. No. 746. P. 195–206.
19. Mozsik G. CAPSAICIN AS A NEW ORALLY APPLICABLE GASTROPROTECTIVE AND THERAPEUTIC DRUG ALONE OR IN COMBINATION IN HUMAN HEALTHY SUBJECTS AND IN PATIENTS // *Prog. Drug. Res.* 2014. No. 68. P. 209–258. DOI: 10.1007/978-3-0348-0828-6\_9
20. Osama A. Shaikh Omar, Hassan M. Bukhari, Naser A. ElSawy, Eslam A. Header EFFICACY OF CAPSICUM FRUTESCENS IN CURING THE PEPTIC ULCER // *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology.* 2013. No. 15 (1). P. 43–54.
21. Mozsik G., Omar M.E. Abdel-Salam, Koji Takeuchi. CAPSAICIN – SENSITIVE NEURAL AFFERENTATION AND THE GASTROINTESTINAL TRACT: FROM BENCH TO BEDSIDE. Publisher: InTech, Croatia, 2014. 320 p. DOI: 10.5772/57289
22. Katary M.A., Salahuddin A. GASTROPROTECTIVE EFFECT OF VANILLIN ON INDOMETHACIN-INDUCED GASTRIC ULCER IN RATS: PROTECTIVE PATHWAYS AND ANTI-SECRETORY MECHANISM // *Clin. Exp. Pharmacol.* 2017. No. 7. P. 232. DOI: 10.4172/2161-1459.1000232
23. Степанюк Н.Г., Томашевський А.В., Степанюк А.Г., Коваль В.С. ХАРАКТЕРИСТИКА ГАСТРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ КОРВИТИНУ НА МОДЕЛІ АСПИРИНОВОЇ ГАСТРОПАТІЇ // *Теоретична і експериментальна медицина.* 2006. № 1. С. 70–73.
24. Pauls F.N., Wick A.N., MacKay E.M. AN ASSAY METHOD FOR ANTIULCER SUBSTANCES // *Gastroenterology.* 1947. No. 8. P. 774–782.
25. Шварц Г.Я., Сюбаев Р. Д. Методологические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. С. 746–758.
26. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1997. С. 66–68.
27. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАТАЛААЗЫ // *Лабораторное дело.* 1988. № 1. С. 16–19.
28. Левицький А.П., Почтар В.М., Макаренко О.А., Гридіна Л.І. АНТИОКСИДАНТНО-ПРООКСИДАНТНИЙ ІНДЕКС СІРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ СТОМАТИТОМ І ЙОГО КОРЕКЦІЯ ЗУБНИМ ЕЛІКСИРАМИ // *Одеський медичний журнал.* 2006. № 1. С. 22–25.
29. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. A RAPID, SIMPLE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF NITRATE AND NITRITE // *Nitric Oxide.* 2001. Vol. 5. No. 1. P. 62–71. DOI: 10.1006/niox.2000.0319

30. Green L.C., Waqner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. ANALYSIS OF NITRATE, NITRITE AND [15N] NITRATE IN BIOLOGICAL FLUIDS // *Analyt. Biochem.* 1982. Vol. 126. P. 131–138. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X
31. Zar J.H. Biostatistical analysis (5th ed.). Englewood Cliffs N.J.: Prentice-Hall, 2010. 751 p.
32. Burdan F., Sek A., Burak B. LEVEL OF MALONDIALDEHYDE AFTER SHORT-TIME OMEPRAZOLE ADMINISTRATION // *Med. Sci. Monit.* 2001. Vol. 7. P. 89–92.
33. Domotor A. Capsaicin-sensitive afferentation and human gastrointestinal tract: Doctoral (Ph.D) Dissertation. Science of Pharmacology Doctoral School “Optimalisation of drug”; Pecs, 2014. 66 p.
34. Szabo I.L., Czimmer J., Mozsik G. CELLULAR ENERGETICAL ACTIONS OF “CHEMICAL” AND “SURGICAL” VAGOTOMY IN GASTROINTESTINAL MUCOSAL DAMAGE AND PROTECTION: SIMILARITIES, DIFFERENCES AND SIGNIFICANCE FOR BRAIN-GUT FUNCTION // *Curr. Neuropharmacol.* 2016. Vol. 14. No. 8. P. 901–913. DOI: 10.2174/1570159X14666160719121725
35. Барышникова Н.В., Белоусова Л.Н., Едемская М.А. НЕСТЕРОИДНЫЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ С ГАСТРОПРОТЕКТОРНЫМ ДЕЙСТВИЕМ – МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ? // *Therapia.* 2015. No. 7/8. С. 51–53.
36. Qandil A.M. PRODRUGS OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS (NSAIDS), MORE THAN MEETS THE EYE: A CRITICAL REVIEW // *Int. J Mol Sci.* 2012. No. 13. P. 17244–17274. DOI: 10.3390/ijms131217244
37. Borhade N., Pathan A.R., Halder S., Karwa M., Dhiman M., Pamidiboina V., Gund M., Deshattiwar J.J., Mali S.V., Deshmukh N.J., Senthilkumar S.P., Gaikwad P., Tipparam S.G., Mudgal J., Dutta M.C., Burhan A.U., Thakre G., Sharma A., Deshpande S., Desai D.C., Dubash N.P., Jain A.K., Sharma S., Nemmani K.V., Satyam A. NO-NSAIDS. PART 3: NITRIC OXIDE-RELEASING PRODRUGS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS // *Chem. Pharm. Bull.* 2012. No. 60 (4). P. 465–481. DOI: 10.1248/cpb.60.465

### References

1. Shakhmatova O.O., Komarov A.L.. ACETILSALICILOVAYA KISLOTA POSLEDNIE NOVOSTI O DOZAH EFEKTIVNOSTI I BEZOPASNOSTI DLITELNOGO LECHENIYA [ACETYLSALICYLIC ACID. THE LATEST NEWS ABOUT DOSES, EFFICACY AND SAFETY OF LONG-TERM TREATMENT]. *Atmosfera. Novosti kardiologii* [Atmosphere. Cardiology news]. 2011. N 3. P.2–10. (In Russ.)
2. Shim Y. K., Kim N. NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG AND ASPIRIN-INDUCED PEPTIC ULCER DISEASE. *Korean J. Gastroenterol.* 2016. No. 67. P. 300–312. DOI: 10.4166/kjg.2016.67.6.300
3. Baigent C., Sudlow C., Collins R., Peto R. COLLABORATIVE META ANALYSIS OF RANDOMISED TRIALS OF ANTIPLATELET THERAPY FOR PREVENTION OF DEATH, MYOCARDIAL INFARCTION, AND STROKE IN HIGH RISK PATIENTS: ANTITHROMBOTIC TRIALISTS' COLLABORATION. *British Medical Journal.* 2002. No. 324. P. 71–86. DOI: 10.1136/bmj.324.7329.71
4. Sung J.J., Lau J.Y., Ching J.Y., Wu J.C., Lee Y.T., Chiu P.W., Leung V.K., Wong V.W., Chan F.K. CONTINUATION OF LOW-DOSE ASPIRIN THERAPY IN PEPTIC ULCER BLEEDING. *Annals of Internal Medicine.* 2010. Vol. 152. No. 1. P. 1–10. DOI: 10.7326/0003-4819-152-1-201001050-00179
5. Hladkykh F., Stepanyuk N. VINBORON PERSHIJ UKRAINSKIJ GASTROPROTEKTOR AGONIST VANILOIDNIH RECEPTORIV (TRPV1) [VINBORON: FIRST UKRAINIAN GASTROPROTECTOR – AGONIST VANILLOID RECEPTOR (TRPV1)]. *Farmakologiya ta likarska toksikologiya* [Pharmacology and drug toxicology]. 2016. No. 50 (5). P. 20–29. URL: [http://pharmtox-j.org.ua/webfm\\_send/523](http://pharmtox-j.org.ua/webfm_send/523) (In Ukr.)
6. Zufarov P.S., Yakubov A.V., Salaeva D.T. SRAVNITELNAYA OCENKA EFEKTIVNOSTI OMEPRAZOLA I PANTOPRAZOLA PRI LECHENII GASTROPATII VYZVANNOJ NESTEROIDNYMI PROTIVOVOSPALITELNYMI SREDSTVAMI U BOLNYH REVMAUTOIDNYM ARTRITOM [COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF OMEPRAZOLE AND PANTOPRAZOLE IN THE TREATMENT OF GASTROPATHY CAUSED BY NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS]. *Likarska sprava* [Likarska on the right]. 2009. No. 3/4. P. 44–49. (In Ukr.)
7. Hladkykh F.V., Stepaniuk N.G. SUCHASNI SHLYAHY POSLABLENNYA ULCEROGENNOSTI NESTEROIDNIH PROTIZAPALNIH ZASOBIV DOSYAGNENNYA NEVIR SHEN PITANNYA TA SHLYAHY OPTIMIZACII [MODERN WAYS OF EASING ULCERATING NSAIDS: ACHIEVEMENT, OUTSTANDING ISSUES AND WAYS TO OPTIMIZE]. *Zaporozhskij medicinskij zhurnal* [Zaporozhye Medical Journal]. 2014. No. 2. P. 82–86. URL: <http://zmj.zsmu.edu.ua/article/view/25437/22932> (In Ukr.)
8. Giuliano C., Wilhelm S., Kale-Pradhan P. ARE PROTON PUMP INHIBITORS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA? A META-ANALYSIS. *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* 2012. No. 5 (3). P. 337–344. DOI: 10.1586/ecp.12.20
9. Drepper M.D., Spahr L., Frossard J.L. CLOPIDOGREL AND PROTON PUMP INHIBITORS – WHERE DO WE STAND IN 2012? *World J. Gastroenterol.* 2012. No. 18 (18). P. 2161–2171. DOI: 10.3748/wjg.v18.i18.2161
10. Bezabeh S., Mackey A.C., Kluetz P., Jappar D., Korvick J. ACCUMULATING EVIDENCE FOR A DRUG-DRUG INTERACTION BETWEEN METHOTREXATE AND PROTON PUMP INHIBITORS. *Oncologist.* 2012. No. 17 (4). P. 550–554. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0431
11. Goldstein J.L., Cryer B. GASTROINTESTINAL INJURY ASSOCIATED WITH NSAID USE: A CASE STUDY

- AND REVIEW OF RISK FACTORS AND PREVENTATIVE STRATEGIES. *Drug, healthcare and patient safety*. 2014. Vol. 7. P. 31-41. DOI: 10.2147/dhps.s71976
12. Pellicano R. GASTROINTESTINAL DAMAGE BY NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS: UPDATED CLINICAL CONSIDERATIONS. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2014. No. 60 (4). P. 255-261.
  13. Garg A., Shoeb A., Moodahadu Subramanya L., Sharma A., Gandhi A., Akku S. AMTOLMETIN: A REAPPRAISAL OF NSAID WITH GASTROPROTECTION. *Hindawi Publishing Corporation. Arthritis*. 2016. Vol. 2016. Article ID 7103705. P 1-5. DOI: 10.1155/2016/7103705
  14. Holzer P. LOCAL EFFECTOR FUNCTIONS OF CAPSAICIN-SENSITIVE SENSORY NERVE ENDINGS: INVOLVEMENT OF TACHYKININS, CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE AND OTHER NEUROPEPTIDES. *Neuroscience*. 1988. No. 24. P. 739-768. DOI: 10.1016/0306-4522(88)90064-4
  15. Holzer P. NEURAL EMERGENCY SYSTEM IN THE STOMACH. *Gastroenterology*. 1998. No. 114. P. 823-839. DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70597-9
  16. Holzer P. TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) CHANNELS AS DRUG TARGETS FOR DISEASES OF THE DIGESTIVE SYSTEM. *Pharmacol. Ther.* 2011. No. 131 (1). P. 142-170. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.006
  17. Geppetti P., Trevisani M. ACTIVATION AND SENSITISATION OF THE VANILLOID RECEPTOR: ROLE IN GASTROINTESTINAL INFLAMMATION AND FUNCTION. *British Journal of Pharmacology*. 2004. No. 141. P. 1313-1320. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705768
  18. Berthoud H.R., Patterson L.M., Willing A.E., Mueller K., Neuhuber W.L. CAPSAICIN-RESISTANT VAGAL AFFERENT FIBERS IN THE RAT GASTROINTESTINAL TRACT: ANATOMICAL IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL INTEGRITY. *Brain Res.* 1997. No. 746. P. 195-206.
  19. Mozsik G. CAPSAICIN AS A NEW ORALLY APPLICABLE GASTROPROTECTIVE AND THERAPEUTIC DRUG ALONE OR IN COMBINATION IN HUMAN HEALTHY SUBJECTS AND IN PATIENTS. *Prog. Drug. Res.* 2014. No. 68. P. 209-258. DOI: 10.1007/978-3-0348-0828-6\_9
  20. Osama A. Shaikh Omar, Hassan M. Bukhari, Naser A. ElSawy, Eslam A. Header EFFICACY OF CAPSICUM FRUTESCENS IN CURING THE PEPTIC ULCER. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*. 2013. No. 15 (1). P. 43-54.
  21. Mozsik G., Omar M.E. Abdel-Salam, Koji Takeuchi. CAPSAICIN – SENSITIVE NEURAL AFFERENTATION AND THE GASTROINTESTINAL TRACT: FROM BENCH TO BEDSIDE. Publisher: InTech, Croatia, 2014. 320 p. DOI: 10.5772/57289
  22. Katary M.A., Salahuddin A. GASTROPROTECTIVE EFFECT OF VANILLIN ON INDOMETHACIN-INDUCED GASTRIC ULCER IN RATS: PROTECTIVE PATHWAYS AND ANTI-SECRETORY MECHANISM. *Clin. Exp. Pharmacol.* 2017. No. 7. P. 232. DOI:10.4172/2161-1459.1000232
  23. Stepanuk N.G., Tomashevsky A.V., Stepanuk A.G., Koval V.S. HAKTERISTIKA GASTROPROTEKTORNOI DII KORVITINU NA MODELI ASPIRINOVOI GASTROPATII [CHARACTERISTICS OF GASTROPROTECTIVE DNA CORVITIN ON THE MODEL OF ASPIRIN GASTROPATHY]. *Teoretichna i eksperimentalna medicina [Theoretical and Experimental Medicine]*. 2006. N 1. P. 70-73. (In Ukr.)
  24. Pauls F.N., Wick A.N., MacKay E.M. AN ASSAY METHOD FOR ANTIULCER SUBSTANCES. *Gastroenterology*. 1947. No. 8. P. 774-782.
  25. Shvarts G.Y., Syubaev R.D. Metodologicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniyu nesteroidnykh protivovospalitelnykh lekarstvennykh sredstv [Methodological recommendations on the preclinical study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast pervaya. Moskva: Grif i K [Guidelines for conducting pre-clinical studies of medicines. Part one. Moscow: Grif i K]*. 2013. P. 746-758. (In Russ.)
  26. Stalnaya I.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoshchyu tiobarbiturovoj kisloty. *Sovremennye metody v biohimii [Method for the determination of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid. Sovremennye metody v biochemii]*. Moskva: Medicina [Moscow: Medicine]. 1997. P. 66-68. (In Russ.)
  27. Korolyuk M.A. Ivanova L.I., Maiorova N.T., Tokarev K.E. METOD OPREDELENIYA AKTIVNOSTI KATALAZY [METHOD FOR DETERMINATION OF CATALASE ACTIVITY]. *Laboratornoe delo [Laboratory work]*. 1998. N 1. P. 16-18. (In Russ.)
  28. Levitsky A.P., Pochtar V.M., Makarenko O.A. ANTIOKSIDANTNO-PROOKSIDANTNIJ INDEKS SIROVATKI KROVI SHCHURIV Z EKSPERIMENTALNIM STOMATITOM I JOGO KOREKCIYA ZUBNIM ELIKSIRAMI [ANTIOXIDANT-PROOXIDANT SYNDROME OF BLOOD SERUM IN EXPERIMENTAL STOMATITIS AND YOIC ROOTING WITH DENTAL OPTICS]. *Odeskij medichnij zhurnal [Odesky meditsynny zhurnal]*. 2006. N 1. P. 22-25. (In Ukr.)
  29. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. A RAPID, SIMPLE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF NITRATE AND NITRITE. *Nitric Oxide*. 2001. Vol. 5. No. 1. P. 62-71. DOI: 10.1006/niox.2000.0319
  30. Green L.C., Waqner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. ANALYSIS OF NITRATE, NITRITE AND [15N] NITRATE IN BIOLOGICAL FLUIDS. *Analyt. Biochem.* 1982. Vol. 126. P. 131-138. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X
  31. Zar J.H. Biostatistical analysis (5th ed.). Englewood Cliffs N.J.: Prentice-Hall, 2010. 751 p.
  32. Burdan F., Sek A., Burak B. LEVEL OF MALONDIALDEHYDE AFTER SHORT-TIME OMEPRAZOLE ADMINISTRATION. *Med. Sci. Monit.* 2001. Vol. 7. P. 89-92.
  33. Domotor A. Capsaicin-sensitive afferentation and human gastrointestinal tract: Doctoral (Ph.D) Dissertation. Science of Pharmacology Doctoral School “Optimalisation of drug”; Pecs, 2014. 66 p.

34. Szabo I.L., Czimmer J., Mozsik G. CELLULAR ENERGETICAL ACTIONS OF “CHEMICAL” AND “SURGICAL” VAGOTOMY IN GASTROINTESTINAL MUCOSAL DAMAGE AND PROTECTION: SIMILARITIES, DIFFERENCES AND SIGNIFICANCE FOR BRAIN-GUT FUNCTION. *Curr. Neuropharmacol.* 2016. Vol. 14. No. 8. P. 901-913. DOI: 10.2174/1570159X14666160719121725
35. Baryshnikova N.V., Belousova L.N., Edemskaya M.A. NESTEROIDNYJ PROTIVOVOSPALITELNYJ PREPARAT S GASTROPROTEKTORNYM DEJSTVIEM MIF ILI REALNOST? [NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS WITH GASTROPROTECTIVE ACTION – MYTH OR REALITY?] *Therapia [Therapia]*. 2014. N 16(12). P. 71-74. (In Ukr.)
36. Qandil A.M. PRODRUGS OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS (NSAIDS), MORE THAN MEETS THE EYE: A CRITICAL REVIEW. *Int. J Mol Sci.* 2012. No. 13. P. 17244-17274. DOI: 10.3390/ijms131217244
37. Borhade N., Pathan A.R., Halder S., Karwa M., Dhiman M., Pamidiboina V., Gund M., Deshattiwar J.J., Mali S.V., Deshmukh N.J., Senthilkumar S.P., Gaikwad P., Tipparam S.G., Mudgal J., Dutta M.C., Burhan A.U., Thakre G., Sharma A., Deshpande S., Desai D.C., Dubash N.P., Jain A.K., Sharma S., Nemmani K.V., Satyam A. NON-NSAIDS. PART 3: NITRIC OXIDE-RELEASING PRODRUGS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS. *Chem. Pharm. Bull.* 2012. No. 60 (4). P. 465-481. DOI: 10.1248/cpb.60.465

**Конфликт интересов**

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Автор:**

**Гладких Фёдор Владимирович** – врач неотложной медицины отделения экстренной (неотложной) медицинской помощи коммунального предприятия «Казатинская центральная районная больница Казатинского районного Совета». Область научных интересов: поиск и изучение новых подходов к улучшению профиля безопасности и повышению эффективности нестероидных противовоспалительных препаратов, изучение механизмов антиульцерогенного действия препаратов с гастропротективной активностью; поиск и изучение химических соединений, пригодных для создания фармакокорректоров воспалительных и ишемических процессов; исследование путей повышения биодоступности лекарственных препаратов.

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com.

ORCID: orcid.org/0000-0001-7924-4048

Researcher ID: researcherid.com/rid/M-5709-2017

SPIN-код РИНЦ: 2126-1563

ResearchGate: researchgate.net/profile/Fedir\_Hladkykh

НБУВ: irbis-nbuv.gov.ua/ASUA/1261931

Academia.edu: independent.academia.edu/FedirHladkykh

**Autor:**

**Hladkykh Fedir Volodymyrovych** – doctor of emergency medicine of the Emergency Medical Aid Department of the Kazatin Central District Hospital of the Kazatinsky District Council. Research interests: search and study of new approaches for improving the safety profile and increasing the effectiveness of nonsteroidal anti-inflammatory drugs; study of the mechanisms of anti-ulcerogenic effects of drugs with gastroprotective activity; search and study of chemical compounds suitable for the creation of pharmacocorrectors of inflammatory and ischemic processes; study ways to increase the bioavailability of drugs.

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

ORCID: orcid.org/0000-0001-7924-4048

Researcher ID: researcherid.com/rid/M-5709-2017

SPIN-cod RINC: 2126-1563

ResearchGate: researchgate.net/profile/Fedir\_Hladkykh

NBUV: irbis-nbuv.gov.ua/ASUA/1261931

Academia.edu: independent.academia.edu/FedirHladkykh

Поступила в редакцию: 25.05.2017

Принята к печати: 08.06.2017

Received: 25.05.2017

Adopted for printing: 08.06.2017





Elsevier, The Netherlands  
Scopus Content Selection Advisory Board (CSAB)  
Association of Science Editors and Publishers, Russia  
Russian Content Selection Advisory Board (RCSAB)

# CERTIFICATE

## OF ATTENDANCE

GIVEN OUT TO SCIENTIFIC PERIODICAL

*Фармация и Фармакология*

to confirm the attendance and presentation to the joint Scopus CSAB and Russian RCAB meeting.

At this meeting, compliance with international standards and selection criteria of the Scopus database, were discussed by experts of Scopus CSAB and Russian RCAB. This meeting took place during the 5th International Scientific and Practical Conference «World-Class Scientific Publication - 2016: Publishing Ethics, Peer-Review and Content Preparation» (May 17, 2016 – May 20, 2016)

May 17-20, 2016

RANEPA  
Moscow, Russia

*K. Holland*

Karen Holland  
Scopus CSAB Subject Chair



Olga V. Kirillova  
Russian CSAB Chair, president ASEP



Ассоциация научных редакторов и издателей, Россия  
Российский экспертный совет по оценке и продвижению российских научных журналов в международные информационные системы (РЭС) / Russian Content Selection Advisory Board (RCSAB)

# СЕРТИФИКАТ

## КАЧЕСТВА

ВЫДАН НАУЧНОМУ ПЕРИОДИЧЕСКОМУ ИЗДАНИЮ

*Фармация и Фармакология*

в подтверждение соответствия международным стандартам и критериям информационной системы Scopus. Оценка журнала проведена экспертами Russian CSAB в период работы Выставки научных журналов участников 5-ой Международной научно-практической конференции "Научное издание международного уровня - 2016: решение проблем издательской этики, рецензирования и подготовки публикаций" (17-20 мая 2016 г., РАНХиГС, г. Москва)

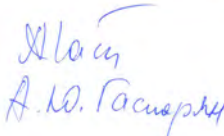
Сертификат является рекомендацией к подаче заявки в базу данных Scopus

17-20 мая 2016 г

РАНХиГС  
Россия, г. Москва

*Olga V. Kirillova*

Ольга В. Кириллова  
Председатель РЭС / Russian CSAB,  
президент АНРИ



Член РЭС / Russian CSAB

