

*На правах рукописи*

**Коннова Мария Алексеевна**

**Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвовой кислоты,  
извлечённой из торфа Нижегородской области**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук**

**Москва – 2024**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии.

**Научный руководитель:**

**Волков Александр Александрович**, кандидат химических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Официальные оппоненты:**

**Мизина Прасковья Георгиевна**, профессор, доктор фармацевтических наук, советник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

**Шорманов Владимир Камбулатович**, профессор, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «12» декабря 2024 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по фармацевтическим наукам по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

**Ученый секретарь**

**диссертационного совета ПДС 0300.021**

**кандидат химических наук, доцент**

**Левицкая Ольга Валерьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Гуминовые (ГК) и фульвовые кислоты (ФК), обнаруживаемые в иле, почве, торфе, лигнине, угле и других природных материалах, представляют собой перспективные биологически активные соединения, которые могут быть полезными в фармации и медицине. Эта группа фенольных соединений, несмотря на их различный состав и строение, проявляет мощные антиоксидантные (*Khuda F. et al., 2022, Csicsor A. et al., 2022, Vašková J. et al., 2023*) и противоопухолевые свойства (*Zolghadr L. et al., 2023, Pant K. et al., 2015*) Кроме того, для этих соединений выявлены противовирусные свойства (*Zhernov, Y.V. et al., 2021, Socol D.C., 2023*), в том числе активность против SARS-CoV-2 (*Hafez M. et al., 2020*), и противовоспалительные свойства (*van Rensburg C.E., 2015, Winkler J. et al., 2018*).

Особое место среди гуминовых производных (ГП) занимают ФК, имеющие существенно меньшую молекулярную массу (менее 1 кДа) и большую концентрацию кислотных и других полярных групп, благодаря чему ФК проявляют более широкий спектр биологической активности (*Pant K. et al., 2015, Shikalgar T.S. et al., 2018, Uspenskaya E.V. et al., 2021*), в том числе, влияя на систему комплемента (*Schepetkin I. et al., 2009, Gao Y. et al., 2017*).

Несмотря на высокую потребность в малотоксичных противовоспалительных веществах природного происхождения, в литературе практически не обсуждаются лекарственные формы (ЛФ) с ФК. Одной из проблем, связанной с разработкой ЛФ на их основе, является сложность их извлечения из природных источников. На сегодняшний день не существует единого метода для разделения и характеристики ГК и ФК. Это связано с тем, что образцы из различных месторождений имеют разное соотношение ГК и ФК. Кроме того, ГК и ФК – это термины, относящиеся не к конкретной химической структуре, а к близким по структуре фенольным кислотам, выделенным из природного сырья. Зависимость структуры и состава ФК от источника создаёт сложности при идентификации и количественном определении этих соединений как потенциальных активных фармацевтических субстанций (АФС).

В литературе имеются разрозненные данные о гелях с ФК. Появились интересные исследования по гелям, содержащих ФК и тимохинон, для лечения псориаза (*Khan R. et al., 2022-2023*). Исследованы гели с ФК для лечения ожогов (*Solovyeva A. et al., 2017*) и экземы (*Gandy J.J. et al., 2011*). Несмотря на многочисленные положительные эффекты ФК в гелях, данная ЛФ не лишена недостатков, которые связаны, во-первых, с лёгкой окисляемостью ФК в водной среде, проблемами, возникающими при хранении гидрогелей. Во-вторых, ФК в растворах способны к

агрегации и образованию более крупных частиц, что также снижает стабильность геля. Трансдермальные пластыри могут стать хорошей альтернативой гелям, в которых ФК более стабильна при хранении, поскольку не склонна к окислению и агрегации в отсутствие растворителя.

**Степень разработанности темы.** Существенный вклад в разработку методов выделения, очистки и количественного определения ГК и ФК внесли исследователи из США (*Lamar R.T. et al., 2014*).

Огромный вклад в изучение структуры и молекулярной организации гуминовых веществ внесли исследователи лаборатории природных гуминовых систем кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова» под руководством И.В. Перминовой (*Perminova I.V. et al., 2021-2023*).

Огромная роль в изучение свойств и биологической активности ГК и ФК внесли исследователи ФГБОУ ВО «Сибирского государственного медицинского университета» Минздрава России (*Belousov M.V. et al., 2009-2022, Zyкова M.V. et al., 2014-2022*) и ФГАОУ ВО «Российского университета дружбы народов» (*Uspenskaya E.V., Syroeshkin A.V., Pleteneva T.V. et al., 2021-2023*).

В 2020 году «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"» (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) разработал патент на применение водорастворимых гуминовых веществ из бурого угля или из чаги для ингибирования репликации коронавируса SARS-CoV-2 (*RU2752872C1*).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Работа соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия по следующим пунктам: 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; 6 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

**Объект и предмет исследования.** Объектами диссертационного исследования выступают гуминовые производные, выделенные из торфа Нижегородской области, а именно фульвовые кислоты (ФК).

*Предметом диссертационного исследования* является поиск оптимальных методов выделения и очистки ФК, поиск физико-химических методов анализа и контроля качества ФК.

**Цель работы:** выделение, исследование, контроль качества и разработка подходов к стандартизации фульвово́й кислоты из низинного торфа Нижегородской области, а также разработка лекарственной формы на её основе.

**Задачи исследования:**

1. Поиск и оптимизация методов выделения, очистки, сушки ФК из торфа Нижегородской области;
2. Разработка методик для идентификации и количественного определения ФК;
3. Разработка внутрилабораторного стандартного образца и подходов стандартизации ФК как потенциальной АФС;
4. Валидация методик количественного определения ФК;
5. Разработка лабораторной технологии и состава трансдермального пластыря с ФК;
6. Исследование биологической активности трансдермального пластыря с ФК в *in vitro* и *in vivo* экспериментах.

**Научная новизна работы.** Впервые получены и охарактеризованы структурные модификации ФК, выделенной из низинного торфа Нижегородской области, в различных условиях экстракции, очистки и сушки. Совокупностью спектральных методов (ИК-, спектрофлуориметрия,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР), оценки растворимости и рН, элементного состава и молекулярной массы установлена структура ФК. Показано влияние условий сушки на структуру ФК. Впервые разработаны методы идентификации ФК и подходы по её стандартизации. Впервые разработан и исследован состав противовоспалительного трансдермального пластыря с ФК.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработанные методики анализа ФК используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 16.05.23) и на фармацевтическом отделении государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж» (акт внедрения от 27.06.23).

Результаты по стандартизации и валидации ФК апробированы в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (акт внедрения от 06.09.23).

Результаты по методам экстракции, очистки, сушки ФК используются в ООО «ЭССОН» (акт внедрения от 19.04.23).

Разработан проект спецификации на ФК низинного торфа Нижегородской области Тоншаевского района, месторождения «Альцевский Мох».

**Методология и методы исследования.** При проведении исследования методологическую основу составили изучение и анализ работ отечественных и зарубежных ученых в области получения и исследования ГК и ФК. Строение и чистота полученных соединений установлены с помощью спектральных методов анализа: ИК-, <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопии, спектрофлуориметрии, атомно-абсорбционной спектрометрии, атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), оптической микроскопии. Биологическую активность (противовоспалительную, антиоксидантную, воздействие на энергетический метаболизм) исследовали в *in vivo* эксперименте на крысах.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Методики выделения, очистки, сушки, идентификации, количественного определения, подходы к методикам стандартизации и валидации ФК, выделенной из низинного торфа Нижегородской области.
2. Результаты идентификации и количественного определения ФК.
3. Данные по лабораторной технологии, составам и свойствам трансдермального пластыря с ФК на эмульсионной основе.
4. Данные по исследованию высвобождения ФК из трансдермального пластыря на эмульсионной основе в экспериментах *in vitro* на ячейке Франца.
5. Данные по исследованию противовоспалительной, антиоксидантной активности и энергетического метаболизма ФК в экспериментах *in vivo* на крысах.

**Степень достоверности полученных результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современного высокотехнологического оборудования для осуществления физико-химического и биологического анализа ФК и

трансдермального пластыря с ней, а также оригинальных программных продуктов – «ChemDraw» (ввод химических структурных формул), «ACD/ChemSketch» (расчёт logP молекул ФК). Все результаты обработаны с использованием программного обеспечения (ПО) соответствующего оборудования и методами статистического анализа с помощью пакетов программ «Microsoft Excel» (Microsoft, США), «Minitab Statistical Software» (Minitab Inc., США), «Statistica» (StatSoft Inc., США).

**Апробация** результатов исследования по диссертации проведена на заседании проблемной комиссии Фармация ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (протокол № 1 от 13.09.2024). Основные результаты исследования представлены в 6 публикациях в ведущих рецензируемых отечественных и международных журналах, 1 учебном пособии, а также в тезисах и устных докладах: VI Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (г. Нижний Новгород, 16-17 марта 2020 г.); VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (г. Нижний Новгород, 17-18 марта 2022 г.); Всероссийская научно-практическая конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Природные соединения и здоровье человека» (г. Иркутск, 25-26 мая 2021 г.); XII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 14 марта-18 апреля 2022 г.); Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием «Аспирантские чтения – 2023: молодые учёные – медицине. Приоритетные направления науки в достижении технологического суверенитета. SIMS – 2023: Samara International Medical Science» (г. Самара, 01 ноября 2023 г.).

**Личный вклад автора.** Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований ФК. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на субстанцию ФК.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, трёх глав собственных исследований, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 173 страницах

машинописного текста, содержит 31 таблицу и 28 рисунков. Список литературы включает 162 работы, из которых 140 – на иностранном языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен литературный обзор по теме диссертационного исследования. В ней обобщены данные по фармакологическим и физико-химическим свойствам ФК, методикам выделения и известным методам анализа.

Глава 2 содержит данные о производителе и поставщике торфа, материалах и методах исследования. Торф и продукты его переработки соответствовали требованиям *ГОСТ 4.105-2014* по показателям азот нитратный (*ГОСТ 27894.4-88*), азот аммиачный (*ГОСТ 27894.3-88*), фосфор (*ГОСТ 27894.5-88*), хлор (*ГОСТ 27894.8-88*), тяжёлые металлы (*ГОСТ Р 53218-2008*). Пробы торфа отбирались, согласно *ГОСТ Р 54332-2011*. Исходным сырьём являлся низинный торф (Т.Н.) месторождения «Альцевский Мох» (Нижегородская область). Свойства Т.Н. также подтверждены элементным анализом, количественным определением воды (Таблица 1).

**Таблица 1.** Свойства торфа. С, Н, О, N, S, P указаны в % от сухого образца, свободного от неорганических примесей.

	Элемент/соединение, % (в/в)							
	H <sub>2</sub> O	Неорг.ост.**	С	Н	О	N	S	P
Т.Н.	10.8	2.0	52.83	4.25	42.92	0.04	0.02	0.02
Торф речной стандарт*	9.3	0.9	51.31	3.53	43.32	2.34	0.76	<0.01

\*Pahoke Peat Standart (Zhang, Y et al., 2022); (International Humic Substances Society Products, 2022-2024)

\*\* в ppm: Ca – 10, Fe – 15, Si – 20, Mg – 10. Тяжёлые металлы отсутствуют (Pb, As, Hg, Cd)

**Методы исследования и приборы:** ИК-спектрофотометр с преобразователем Фурье «IRAffinity-1S» (Shimadzu, Япония); спектрометр ядерного магнитного резонанса JNM-ECX400 (JEOL, Япония); электронный сканирующий микроскоп (СЭМ) JSM-IT300LV (JEOL, Япония); спектрофлуориметр CM 2203 (Solar, Республика Беларусь); атомно-абсорбционный спектрофотометр AA-7000 (Shimadzu, Япония); АЭС-ИСП проводили на спектрометре Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs, США).

Обратное и прямое титрование, определение кислотных групп ацетатным методом проводили в соответствии с методикой (Melnikova N. et al., 2017).

**Базовый состав трансдермального пластыря с ФК готовили следующим образом:** а) ПВП К-17 (0,5 г), ПЭО-400 (0,02 г), ПЭО-1500 (0,2 г) добавляли в 2 мл 0,8% раствора ФК; б) ксантановую камедь (0,1 г), глицерин (0,4–0,5 г) и 5 мл воды очищенной смешивали до однородности в другой ёмкости; в) после смешивания продуктов (а) и (б) последовательно вводили Твин 80 (0,14 г) и расплавленный эмульсионный воск (0,1 г) при нагревании на водяной бане при температуре 80 °С в течение 10 мин.; г) полученную массу сушили в печи при температуре 50 °С в течение 1 суток до получения плёнки.

**Высвобождение** ФК из трансдермального пластыря через целлюлозную мембрану оценивали в соответствии с тестом «Растворение» для трансдермальных пластырей (ОФС.1.4.2.0017.15), а также с использованием диффузионной ячейки Франца объёмом 4,35 мл в условиях, близких к физиологическим (PBS 7,4; t=37 °С; ацетилцеллюлозная мембрана).

**Исследования антиоксидантной активности** проводили на 7-й день лечения на эритроцитах и плазме крови крыс. Интенсивность ПОЛ определяли по уровню малонового диальдегида (МДА). Удельную активность ферментов (каталазы, глутатионредуктазы – ГР, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа – Г6ФД, альдегиддегидрогеназы – АлДГ) и каталитические свойства лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции (ЛДГ<sub>прям.</sub> и ЛДГ<sub>обр.</sub>) определяли спектрофотометрическим методом (Соловьева А.Г., 2010-2023). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина (Сирота Т.В., 2012). **Исследования противовоспалительной активности *in vivo*** проводили на крысах с адьювант-индуцированным артритом (АИА) (Ozawa J. et al, 2010). Интенсивность воспалительного процесса оценивали по общему количеству лейкоцитов в крови ( $10^9$ /л), концентрации С-реактивного белка (нг/мл) и ревматоидного фактора – РФ (МЕ/мл).

Основные результаты исследований и их обсуждения представлены в **главах 3, 4 и 5:**

### **1. Получение и исследование физико-химических свойств фульвовой кислоты**

ФК получали первоначальной экстракцией из торфа. Кислотно-щелочная и спиртовая экстракцию торфа проводилась с использованием ультразвука (УЗ). Общая схема различных методов выделения ФК представлена на рисунке 1.

Торф (200 г) подвергался УЗ-спиртовой экстракции и УЗ-щелочному гидролизу в течение 1 ч при 80°C, гумин удалялся центрифугированием. Конечный раствор подкисляли  $H_2SO_{4\text{конц.}}$  до pH 1–2 и удаляли ГК. Очистка ФК после кислотно-щелочной экстракции проводилась по методу Ламара (*Lamar R.T. et al., 2014*).

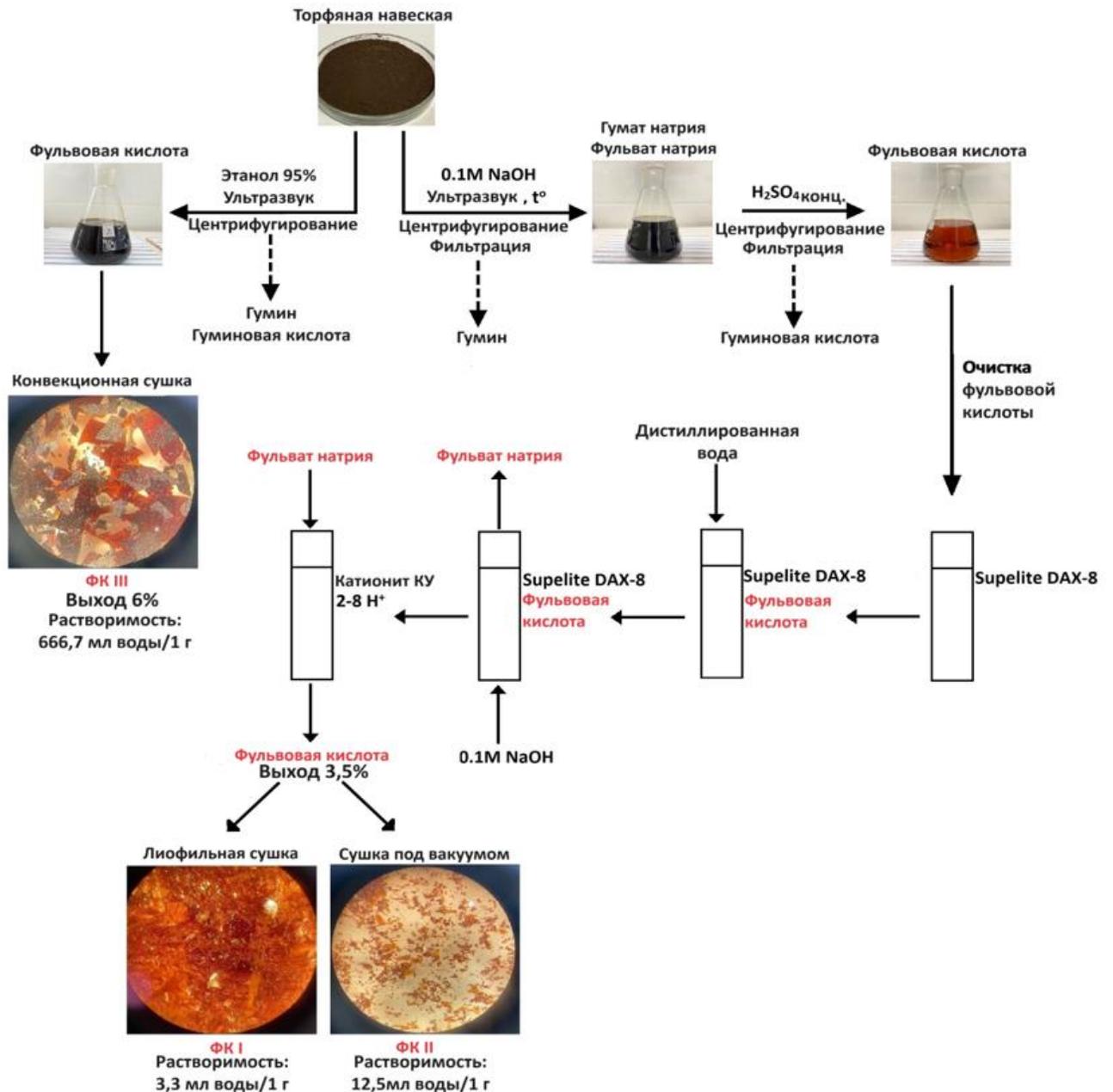


Рисунок 1. Методы получения ФК, используемые в работе

Источник: составлен автором

### 1.1. Свойства фульвой кислоты, полученной разными способами

Полученные образцы ФК имели различный внешний вид (цвет, форму) в зависимости от способа выделения и сушки ФК. На рисунке 1 показаны фотографии полученных образцов. Метод-1 – УЗ-щелочная экстракция торфа с получением ФК по методу Ламара и последующей лиофильной сушкой от  $-80$  до  $-40^{\circ}\text{C}$  в течение 8 ч (ФК I). Метод-2 – УЗ-щелочная экстракция торфа с получением ФК по методу Ламара и последующей сушкой под вакуумом 1 мм рт. ст. при  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 6 ч. (ФК II). Метод-3 – УЗ-спиртовая экстракция торфа с последующей конвекционной сушкой при  $100^{\circ}\text{C}$  (ФК III).

Максимальный выход ФК обеспечивает метод-3 (6%), однако наименьший процент примесей, необходимая структура и свойства ФК были получены при использовании метода-1. Содержание азота, определенное методом Кьельдаля в анализируемом образце ФК I не превышало во всех случаях 0,17%. Это позволяет предположить, что азотсодержащие соединения присутствуют только в виде примесей (Таблица 2). Кроме того, анализ всех трех образцов показал, что полученные модификации ФК, имея близкий элементный состав, различались по растворимости. Растворимость ФК I (3,3 мл воды на грамм) в 200 раз выше, чем у ФК III, (666,7 мл воды на грамм) и в 4 раза выше, чем у ФК II (12,5 мл воды на грамм) (Таблица 3).

**Таблица 2.** Микроэлементный состав примесей в продуктах, выделенных из торфа

№	Продукты	Микроэлементный состав		Примечания
		Металлы (в ppm)	Азот, сера, фосфор (в %)	
1	Na-ГК + Na-ФК	Ca – 2, Fe – 10, Si – 10, Mg – 3	[N] – $0,17 \pm 0,02$	Торф измельченный и просеянный обработан 0,1 М NaOH и ультразвуком при нагревании ( $80^{\circ}\text{C}$ )
2	ФК	Ca – 2, Fe – 10, Si – 10, Mg – 3	[N] – $0,11 \pm 0,02$	Продукт 1, обработанный $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{конц}}$ . Очистка по методу Ламара

Таким образом, несмотря на более высокий выход ФК по методу-3, получение ФК по методу-1 приводит к получению образцов ФК, сохраняющих высокую растворимость и стабильность при хранении в эксикаторе в течение полугода. В дальнейшем в работе нами

использовалась ФК I и образец с минимальным содержанием азота и микроэлементов был использован как внутрилабораторный стандартный образец.

### 1.2. Физико-химические характеристики фульвово́й кислоты

В таблице 3 приведены свойства ФК, полученной разными методами.

**Таблица 3.** Свойства ФК, полученной разными методами

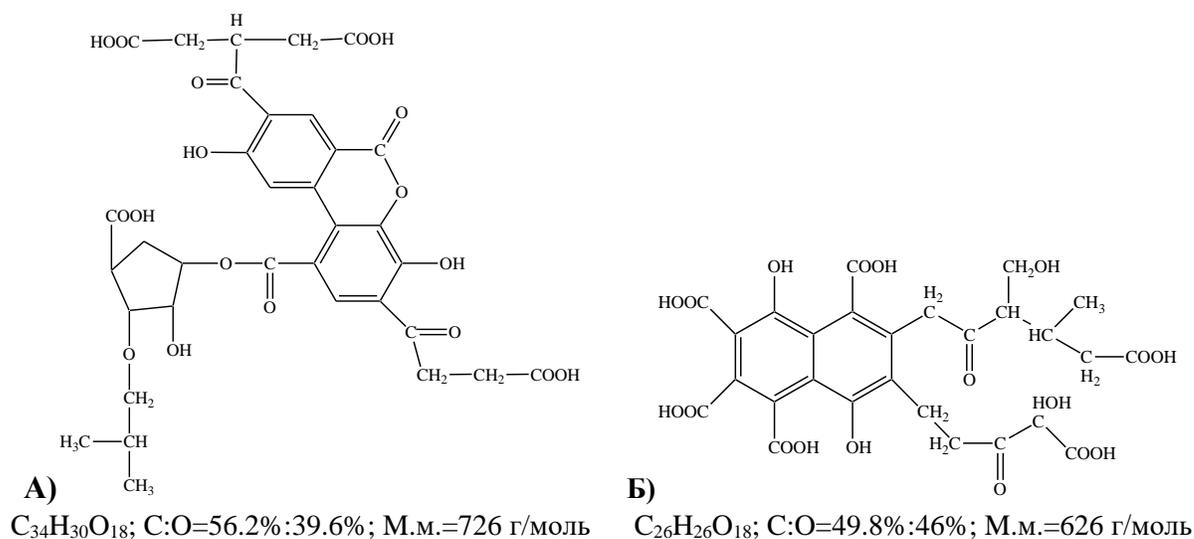
Показатель	ФК I	ФК II	ФК III
Внешний вид	светло-коричневые воздушные игольчатые пластинки	светло-коричневые прозрачные пластинки	тёмно-коричневые спёкшиеся пластинки
<b>Растворимость (мл воды/г)</b>	<b>3,3</b>	<b>12,5</b>	<b>666,7</b>
C, %	56,0±2,1	56,0±2,2	59,0±1,2
O, %	38,0±2,3	38,0±2,1	36±2,0
Кислотные карбоксильные группы, ммоль-экв/г	7,1±0,3	6,8±0,1	6,2±0,4
Фенольные группы, ммоль-экв/г	4,8±0,1	4,6±0,2	4,0±0,3
Сумма кислотных групп, ммоль-экв/г	12,0±0,5	11,4±0,3	10,2±0,2
Дзета-потенциал, мВ	-27,9±0,2	-25,6±0,2	-6,4±0,2
pH (0,01%)	2,1±0,1	3,0±0,1	5,1±0,2
D <sub>av.</sub> , нм (DLS)	8,0±0,6	10,0±0,5	20,0±0,5

Анализ кислотных групп, как карбоксильных, так и фенольных, в образцах ФК (ФК I, ФК II, ФК III) показал их высокое содержание: от 6,2 до 7,1 для карбоксильных групп и от 4,0 до 4,8 для фенольных групп соответственно (Таблица 3). Образец ФК I характеризуется максимальным наличием полярных функциональных групп (12,0±0,5 ммоль-экв/г), большей концентрацией фенольных гидроксильных групп, более высоким значением отрицательного дзета-потенциала, что характеризует устойчивость частиц к агрегации.

Данные Фурье-ИК спектров подтверждают наличие карбоксильных и фенольных групп в составе ФК: 3394 см<sup>-1</sup> (гидроксил в карбоксильной, спиртовой и фенольной группах), 2937, 2920, 2850 см<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>-, -CH-), 1716 см<sup>-1</sup> (C=O в карбонильных группах), 1608 см<sup>-1</sup> (C=O в карбоксильных группах), 1280 см<sup>-1</sup> (C-O в фенольном гидроксиле).

Строение полученных продуктов подтверждено твердотельным  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\delta$ , м.д. для атомов углерода): 0-50 (алифатические), 95-106 (полуацетальные), 115-120 (олефиновые), 108-165 (ароматические), 60-96, 160-140 (О-замещённые), 165-190 (карбоксильные), 197-198 (карбонильные).

На основании твердотельного  $^{13}\text{C}$  ЯМР, ИК-Фурье спектров, соотношения карбоксильных и фенольных групп (2:1), соотношения углерода и кислорода (1,5:1) можно предположить, что полученные нами образцы ФК могут иметь фрагменты, подобные структурам, показанным на рисунке 2. Методом криоскопии определена молекулярная масса (М.м.) структурного звена молекулы ФК в образце ФК I, равная 740 г/моль. Эта величина близка к литературным данным по математическим моделям ФК, в соответствии с которыми молекулярная масса ФК лежит в интервале 620-750 г/моль (*Alvarez-Puebla R.A. et al., 2006*); (*Bezugloza O., 2019*); (*Guanqun G., et al., 2022*); (*Samiosa L. et al., 2007*).



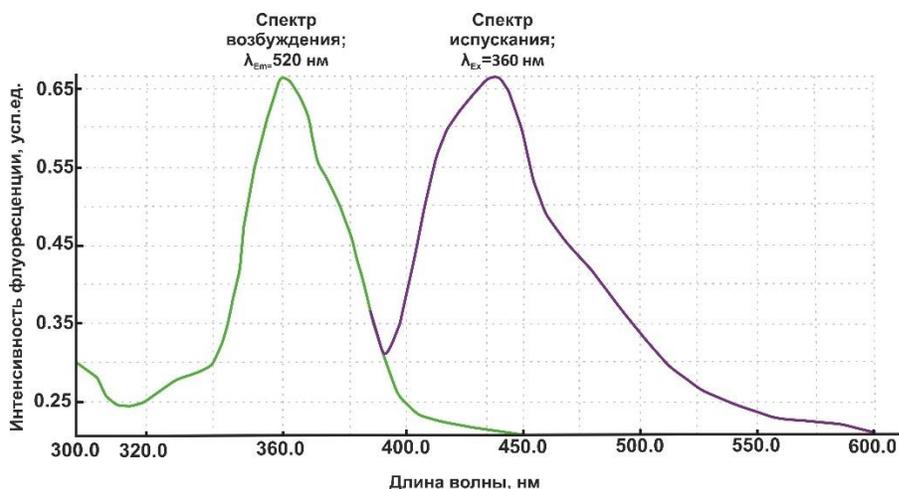
**Рисунок 2.** Возможная структура полученной нами ФК

*Источник: составлен автором*

Структурная упаковка молекул ФК зависит от внутри- и межмолекулярных водородных связей, которые могут способствовать образованию различных супрамолекулярных структур, как в твёрдом состоянии, так и в водных растворах. В нашей работе данный процесс зависел от условий сушки. Молекулы ФК, образующие супрамолекулярные структуры, способны

агрегировать в наночастицы, средний размер которых варьирует от 8–10 нм (ФК I, ФК II) до 20 нм (ФК III).

Флуоресцентные спектры в режимах возбуждения ( $\lambda_{Em}=520$  нм) и испускания ( $\lambda_{Ex}=360$  нм) для образцов ФК I, совпадали с литературными данными, указанными *Sun X. et al., 2022* и *Bertoncini E.I. et al., 2005* для их стандартных образцов ФК. На рисунке 3 проиллюстрированы спектры флуоресценции ФК I, регистрируемые в разных режимах.



**Рисунок 3.** Флуоресцентные спектры водных растворов ФК I (10 мкг/мл)

*Источник: составлен автором*

Таким образом, полученный образец ФК I по методу 1 может быть однозначно охарактеризован для идентификации других образцов, и может быть использован для количественного определения ФК в качестве внутрилабораторного стандарта.

## 2. Подходы к стандартизации фульвовой кислоты как потенциальной АФС

Испытания образцов ФК по показателю **подлинность** предполагают проведение комплекса физико-химических исследований, подтверждающих свойства анализируемого образца ФК при сравнении с внутрилабораторным стандартом. Свойства: внешний вид, растворимость в воде по *ОФС.1.2.1.0005.15* (не более 5,0 мл воды на грамм), общее количество карбоксильных и фенольных групп (не менее 12,0 ммоль-экв/г), рН 0,01% раствора (не более 3), совпадение Фурье-ИК-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров и спектров флуоресценции.

**Специфичность** методики испытания на подлинность оценивалась по совпадению спектров Фурье-ИК,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР и флуоресценции (Таблица 4) анализируемого образца ФК, внутрилабораторного стандартного образца и по различию спектров ФК и структурно близкого вещества – ГК. Интенсивность полос пропускания в ИК-спектрах **ФК**:  $T_{\text{COOH}}/T_{\text{C=O}}$  ( $T_{1600-1650}/T_{1716-1720}$ ) = **2,0-2,3**; **ГК**:  $T_{\text{COOH}}/T_{\text{C=O}}$  ( $T_{1600-1650}/T_{1716-1720}$ ) = **1,0-1,2**. Интенсивность сигналов  $^{13}\text{C}$  ЯМР **ФК**:  $I_{60-80}/I_{100-120}$  = **1-50-1,56**; **ГК**:  $I_{60-80}/I_{100-120}$  = **2,1-2,5**.

**Таблица 4.** Специфичность флуоресцентного метода установления подлинности ФК

Вещество	Среда	Спектр возбуждения при $\lambda_{\text{Em}}=520$ нм	
		$\lambda=360$ нм	$\lambda=460$ нм
<b>ФК</b>	Вода	<b>0,675</b>	0,285
ГК		-	-
<b>ФК</b>	Спирт 95%	<b>0,553</b>	0,025
ГК		-	-

Основной **примесью** в субстанции ФК являются азотсодержащие соединения, которые мы контролировали по показателю «содержание азота» ( $<0,17\%$ ), согласно *ОФС.1.2.3.0011.15*. **Содержание тяжёлых металлов** контролировалось методами ААС и АЭС-ИСП, согласно *ОФС.1.5.3.0009.15*. В исходных образцах торфов и полученной ФК достоверно отсутствовали ионы тяжёлых металлов: Pb, As, Hg, Cd.

### 2.1. Количественное определение фульвово́й кислоты

Количественное определение ФК проводили методом спектрофлуориметрии по спектру возбуждения (Рисунок 3).

**Специфичность** методики определялась по соответствию интенсивности флуоресценции растворов образцов ФК с интенсивностью флуоресценции раствора внутрилабораторного стандартного образца ФК известной концентрации и образца ФК в присутствии примеси – ГК измеренной в идентичных условиях на одном и том же приборе. Относительное стандартное отклонение (RSD) отдельного результата не превышало 2,0% по показателю специфичность (Таблица 5). Таким образом, методика удовлетворяла критерию специфичности.

**Таблица 5.** Результаты расчета относительного стандартного отклонения интенсивности флуоресценции для растворов ФК, внутрилабораторного стандарта ФК, примеси – ГК с концентрацией 5 мкг/мл

Образец	Интенсивность флуоресценции растворов ФК, усл.ед.			Среднее значение интенсивности флуоресценции, усл.ед.	SD	RSD, %
ФК	0.319	0.325	0.327	0.324	$5.39 \cdot 10^{-3}$	1.67
Внутрилабораторный стандарт ФК	0.321	0.320	0.328	0.323	$5.05 \cdot 10^{-3}$	1.56
ФК+ГК	0.325	0.328	0.330	0.327	$3.15 \cdot 10^{-3}$	0.96
ГК	–	–	–	–	–	–

**Правильность** оценивали по относительному отклонению RSD, % на основании сравнения фактического и заданного количества внутрилабораторного стандарта. Метод удовлетворяет критериям правильности, если относительное отклонение измеренного фактического значения ФК от истинного значения внутрилабораторного стандарта ФК не превышает  $\pm 2\%$ . Метрологические характеристики по показателю правильность проводили также с помощью одновыборочного t-критерия Стьюдента (Таблица 6).

**Таблица 6.** Метрологические характеристики методики количественного определения ФК при определении показателя правильности

$n$	$f$	$X_{cp.}$	$S^2$	$S$	$S_{cp.}$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$\Delta X_{cp.}$	$\varepsilon_{cp.}, \%$	$RSD, \%$
5	4	9.88	$1.07 \cdot 10^{-2}$	$1.04 \cdot 10^{-1}$	$5.98 \cdot 10^{-2}$	95	2.78	$\pm 0.29$	$\pm 0.13$	1.30	1.05

Исходя из результатов статистической обработки проведённых опытов, можно сказать о том, что ошибка единичного определения количества ФК с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 1.30\%$ , то есть методика удовлетворяет критерию правильности (таблица 6).

**Линейность** методики определяли для серии растворов ФК (с концентрациями в диапазоне линейности от 1 до 10 мкг/мл). Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации имел вид  $Y=aX+b$  (Рисунок 4), коэффициент корреляции  $R^2=0.9934$ , что подтверждает линейность методики. Предел обнаружения ФК составлял 0,3 мкг/мл.

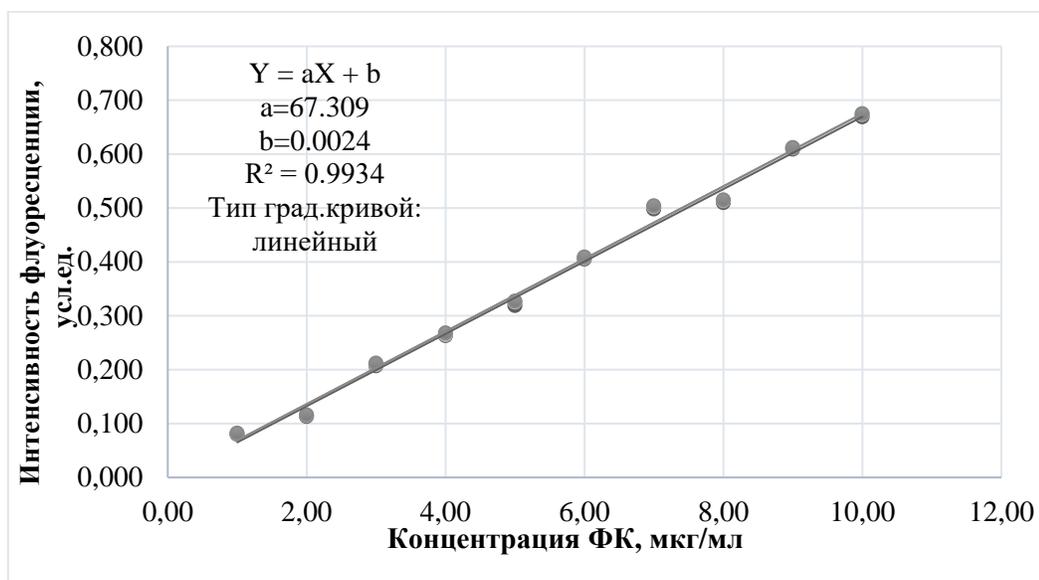


Рисунок 4. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ФК

*Источник: составлен автором*

Для определения **прецизионности** (повторяемости и воспроизводимости) мы проводили многократно испытания при соблюдении следующих условий. **При определении повторяемости** проводили измерения количества ФК в пределах короткого промежутка времени в одной и той же лаборатории, на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, с использованием одного и того же прибора. **При определении воспроизводимости** измерения проводили с использованием одной и той же пробы ФК и методики её количественного определения в лаборатории государственного автономного учреждения здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (ГАУЗ НОЦККСЛС). Прецизионность методики подтверждалась, если коэффициент вариации составлял не более 2% (Таблица 7).

**Таблица 7.** Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности методики

Концентрация раствора ФК, мкг/мл	День эксперимента	Среднее значение интенсивности флуоресценции из трёх измерений, усл.ед.	SD	RSD, %
Кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии				
10.0	1	0.669	$3.89 \cdot 10^{-3}$	0.58
	2	0.671		
	3	0.672		
5.0	1	0.320	$5.39 \cdot 10^{-3}$	1.65
	2	0.324		
	3	0.327		
1.0	1	0.080	$1.22 \cdot 10^{-3}$	1.51
	2	0.081		
	3	0.081		
Лаборатория ГАУЗ НОЦККСЛС				
10.0	1	0.672	$7.84 \cdot 10^{-3}$	1.16
	2	0.675		
	3	0.678		
5.0	1	0.321	$3.73 \cdot 10^{-3}$	1.15
	2	0.323		
	3	0.327		
1.0	1	0.070	$1.33 \cdot 10^{-3}$	1.88
	2	0.070		
	3	0.072		

По результатам исследований разработан **проект спецификации «Фульвовая кислота низинного торфа Нижегородской области, месторождения «Альцевский Мох»»:**

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМА
Описание	Визуальный	Светло-коричневые воздушные игольчатые пластинки
Растворимость	ОФС.1.2.1.0005.15	Растворима в воде, растворима в этаноле 96%
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр исследуемой субстанции должен соответствовать ИК-спектру стандартного образца фульвовой кислоты. Соотношение пропускания полос валентных колебаний $T_{\text{COOH}}/T_{\text{C=O}}(T_{1600-1650}/T_{1716-1720}) = 2,0-2,3$
	ЯМР-спектроскопия	$^{13}\text{C}$ ЯМР-спектры исследуемой субстанции должны соответствовать $^{13}\text{C}$ ЯМР-спектрам стандартного образца фульвовой кислоты. Соотношение интенсивностей сигналов $I_{60-80 \text{ м.д.}}/I_{100-120 \text{ м.д.}} = 1,50-1,56$

	Спектрофлуориметрия	Должна наблюдаться полоса при 360 нм ( $\lambda_{Em}=520$ нм) в спектрах возбуждения
	Элементный анализ	Содержание С должно быть не более 56%, а содержание О не менее 40%
	Сумма кислотных групп [COOH+Ph-OH]	Не менее 12 ммоль-экв/г
	pH	Водный 0,01% раствор исследуемой субстанции должен иметь pH не более 3
Посторонние примеси	ОФС.1.2.3.0011.15	Суммарное содержание азота не более 0,17%, гуминовые кислоты не более 3%.
Потеря в массе при высушивании при 105°C в течение часа	ОФС.1.2.1.0010.15	Не более 0,5%
Сульфатная зола	ОФС.1.2.2.2.0014.15	Не более 0,1%
Тяжёлые металлы	ОФС.1.5.3.0009.15	Не более: Pb — 6,0 мг/кг, Cd — 1,0 мг/кг, As — 0,5 мг/кг, Hg — 0,1 мг/кг
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.18	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Общее число аэробных микроорганизмов – не более КОЕ в 1 г (мл)</li> <li>- Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более КОЕ в 1 г (мл)</li> <li>- Отсутствие Escherichia coli в 1 г (мл)</li> <li>- Отсутствие бактерий рода Salmonella в 25 г (мл)</li> <li>- Отсутствие Pseudomonas aeruginosa в 1 г (мл)</li> <li>- Отсутствие Staphylococcus aureus в 1 г (мл)</li> <li>- Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более КОЕ в 1 г (мл)</li> </ul>
Количественное определение	Спектрофлуориметрия	от 95 до 105% в пересчете на сухое вещество
Хранение	В хорошо закупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10°C.	
Срок годности	3 года	

### 3. Разработка состава эмульсионных трансдермальных пластырей с фульвовой кислотой

В качестве основы трансдермального пластыря была выбрана гидрофильная эмульсионная основа «масло-в-воде». Для улучшения солюбилизации ФК, склонной к агрегации в водных средах, нами были использованы плуроники с различным соотношением гидрофильных и липофильных фрагментов. В качестве внутреннего положительного контроля был использован ДМСО, известный своими хорошими транскутантными свойствами.

### 3.1. Исследование высвобождения фульвовой кислоты из трансдермального пластыря

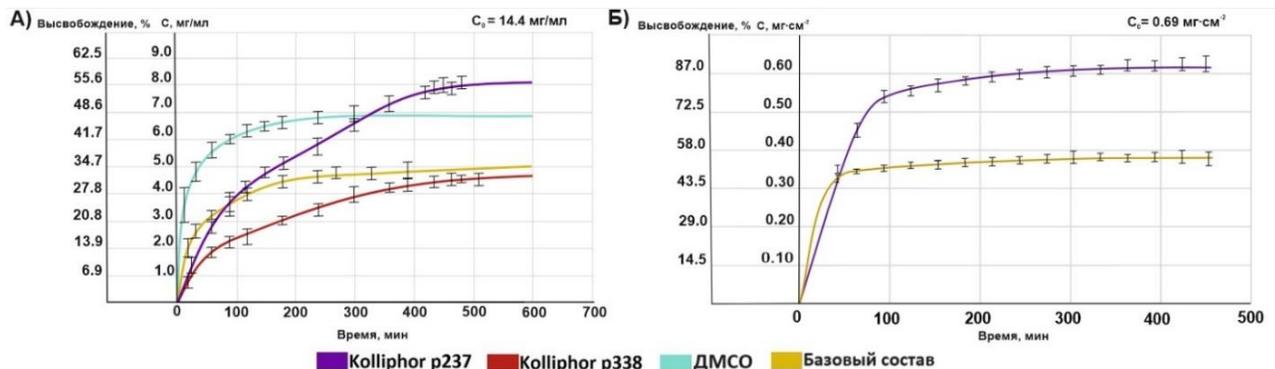
При оценке высвобождения ФК из трансдермального пластыря в качестве среды использовалась вода очищенная при температуре  $(32,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . В таблице 8 и на рисунке 5(А) показаны результаты исследования высвобождения ФК из трансдермальных пластырей через ацетилцеллюлозную мембрану. Результаты сравнивали с базовым составом.

**Таблица 8.** Результаты высвобождения ФК из трансдермальных пластырей

Цвет кривой	Пластырь	$C_{\text{ФК}}, \text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$	Высвобождение, %	Время выхода на плато, ч
	Kolliphor p237	$8,1 \pm 0,2$	56,2	8,3
	ДМСО	$6,7 \pm 0,2$	46,5	5,0
	Kolliphor p338	$4,6 \pm 0,3$	31,9	8,5
	Базовый состав	$4,8 \pm 0,2$	33,3	6,5

Высвобождение ФК из пластыря с базовым составом, в который дополнительно вводился плуроник Kolliphor p237, было максимальным и достигало 56% за 600 минут.

Сравнение высвобождения ФК из пластырей методом диализа и с использованием диффузионной ячейки Франца (Рисунок 5(Б)) подтвердили высокую эффективность пластыря с плуроником Kolliphor p237.



**Рисунок 5.** Зависимость высвобождения ФК из трансдермальных пластырей от времени

*Источник: составлен автором*

Таким образом, нами разработан состав трансдермального пластыря с ФК, дополнительно содержащий плуроник Kolliphor p237 с максимальным высвобождением ФК.

#### **4. Биологическая активность пластыря с фульвовой кислотой на модели адьювант-индуцированного артрита у крыс**

Биологические свойства ФК в трансдермальных пластырях оценивались по влиянию на антиоксидантную ферментную защиту на 7-й день лечения на эритроцитах и плазме крови крыс по отношению к интактным крысам. После 7-дневного лечения (с 15 по 21 день эксперимента) трансдермальными пластырями с базовым составом и с Kolliphor p237 уровень удельной активности всех ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, ГР, Г6ФД, ЛДГ<sub>прям.</sub>, ЛДГ<sub>обр.</sub>), биохимические показатели ПОЛ (активность АлДГ, уровень МДА) и маркеры воспаления (скорость оседания эритроцитов – СОЭ, количество лейкоцитов, концентрация С-реактивного белка, концентрация ревматоидного фактора – РФ вернулись к норме и были близки к уровню в группе интактных животных (положительный контроль).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенных исследований получена водорастворимая фульвовая кислота из низинного торфа Нижегородской области России, были изучены её физико-химические и биологические свойства. Предложен состав трансдермального пластыря с фульвовой кислотой для лечения воспалительных процессов.

### **ВЫВОДЫ**

1. Впервые экспериментально обоснованы особенности выделения фульвовой кислоты из низинного торфа Нижегородской области (месторождение «Альцевский Мох»). Узщелочная экстракция, очистка по методу Ламара и лиофильная сушка позволяют получить фульвовую кислоту с наибольшей чистотой. Показано, что на структуру фульвовой кислоты, её коллоидно-химические свойства наиболее влияют условия сушки на заключительном этапе.
2. Впервые разработаны методики идентификации и количественного определения фульвовой кислоты из торфа месторождения «Альцевский Мох». Было выявлено, что в зависимости от способа извлечения, фульвовые кислоты различаются по растворимости, дзета-потенциалу, значению рН, количеству фенольных и карбоксильных кислотных групп, размеру частиц. Данные ИК-, <sup>13</sup>С-ЯМР спектров, спектров флуориметрии могут быть использованы при идентификации фульвовой

кислоты. Высокая концентрация кислотных групп (12 ммоль-экв/г), легкая растворимость (3,3 мл воды на грамм) фульвовой кислоты, полученной с помощью лиофильной сушки, позволяют предложить эти образцы в качестве внутрилабораторного стандарта.

3. Разработаны подходы к валидации методик установления подлинности и количественного определения фульвовой кислоты по показателям специфичность, правильность, линейность, прецизионность. Показано, что методика количественного определения методом спектрофлуориметрии соответствует критериям: специфичность (RSD отдельного результата не превышал 2%), правильность (ошибка единичного определения количества ФК с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 1.30\%$ ), линейность ( $R^2=0.9934$ ), прецизионность, как внутрилабораторная, так и межлабораторная (RSD не более 2%).
4. Разработан проект спецификации на фульвовую кислоту низинного торфа Нижегородской области, месторождения «Альцевский Мох» на основании внутрилабораторного стандартного образца.
5. Впервые разработан и исследован состав трансдермального пластыря с фульвовой кислотой на эмульсионной основе.
6. В исследовании *in vitro* высвобождения фульвовой кислоты из трансдермального пластыря с использованием диффузионной ячейки Франца показали его высокую эффективность (56% и 90% соответственно за 8 ч).
7. В экспериментах *in vivo* на крысах установлено ингибирование процессов перекисного окисления липидов. Наблюдалось снижение тяжести заболевания и интенсивности воспаления.

## Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

### Международные базы цитирования:

1. **Коннова, М.А.** Сравнительная характеристика основ различного назначения для гидрофильных субстанций / **М.А. Коннова, А.А. Волков, А.В. Грехов** // Биофармацевтический журнал. – 2022. – Т. 14. – N 5. – С. 3-7.
2. **Konnova, M.A.** Features of Obtaining and Properties of Fulvic Acid from the Peat of Nizhny Novgorod Region / **M.A. Konnova, A.A. Volkov, S.G. Kostyukov, N.B. Melnikova** // Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences. – 2023. – V. 9. – N 9. – P. 617-628. DOI: 10.36348/sjimps.2023.v09i09.004
3. **Konnova, M.A.** Anti-Inflammatory Property Establishment of Fulvic Acid Transdermal Patch in Animal Model / **M.A. Konnova, A.A. Volkov, A.G. Solovyeva, P.V. Peretyagin, N.B. Melnikova** // Scientia Pharmaceutica. – 2023. – V. 91. – N 45. DOI: 10.3390/scipharm91040045
4. **Konnova, M.A.** Fulvic acid transdermal patch: Its properties, optimization and release / **M.A. Konnova, A.A. Volkov, N.B. Melnikova** // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. – 2024. – V. 14. – N 4. DOI: 10.22270/jddt.v14i4.6497

### Статьи в журналах, рецензируемых ВАК

5. **Коннова, М.А.** Разработка и сравнительный анализ составов трансдермальных пластырей с гуминовыми производными / **М.А. Коннова, А.А. Волков** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. – 26. – N 10. – С. 3-11. DOI: 10.29296/25877313-2023-10-03.
6. **Коннова, М.А.** Стандартизация фульвовой кислоты из торфа Нижегородской области / **М.А. Коннова, А.А. Волков, Н.Б. Мельников** // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2024. – Т. 26. – N 7 – С. 138-143.

### Учебное пособие

7. Мелникова, Н.Б. Материалы и технология мазей, гелей, трансдермальных пластырей, полимерных пленок и контроль их качества : учебное пособие [Электронный ресурс] / Н.Б. Мельникова, **М.А. Коннова**, Д.А. Пантелеев, О.А. Казанцев, Д.В. Орехов, А.В. Князев // ННГУ им. Н. И. Лобачевского. - Нижний Новгород : Изд-во ННГУ, 2024. – 86 с.  
– Режим доступа: <https://e-lib.unn.ru/MegaPro/UserEntry?Action=FindDocs&ids=892395&idb=0>.

**Коннова Мария Алексеевна**

(Российская Федерация)

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ  
СТАНДАРТИЗАЦИИ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ, ИЗВЛЕЧЁННОЙ ИЗ ТОРФА  
НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ**

Диссертационная работа посвящена изучению свойства фульвокислоты, выделенной из торфа Нижегородской области России. Показано, что очистка продукта методом Ламара может приводить к образованию нескольких образцов одного и того же состава, но разной структуры (Фурье-ИК-спектроскопия, твердотельный  $^{13}\text{C}$  ЯМР, спектрофлуориметрия, атомно-абсорбционная спектрометрия, атомно-эмиссионной спектроскопия с индуктивно связанной плазмой, СЭМ, оптическая микроскопия, концентрация карбоксильных и фенольных групп). На формирование и свойства полиморфных супрамолекулярных структур большое влияние оказывает режим сушки. Для оптимального водорастворимого образца фульвовой кислоты были разработаны методики идентификации и количественного определения, были изучены её физико-химические и биологические свойства в составе трансдермальных пластырей.

**Konnova Maria Alekseevna**

(Russian Federation)

**OBTAINING, RESEARCH AND DEVELOPMENT OF FULVIC ACID  
STANDARDIZATION APPROACHES FROM THE PEAT OF NIZHNY NOVGOROD  
REGION**

The dissertation work is devoted to the study of the fulvic acid properties obtained from the peat in Nizhny Novgorod region of Russia. It has been shown that purification of the product by the Lamar method can lead to the several samples formation of the same composition, but different structures (FTIR spectroscopy, solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, spectrofluorimetry, atomic absorption spectrometry, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, SEM, optical microscopy, concentration of carboxyl and phenolic groups). The formation and properties of polymorphic supramolecular structures are greatly influenced by the drying mode. For the optimal water-soluble fulvic acid sample, identification methods and assay were developed, and its physicochemical and biological properties in the fulvic acid transdermal patches were studied.