

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПРИВОЛЖСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Волков Александр Александрович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. СВОЙСТВА ФУЛЬВОВЫХ КИСЛОТ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1. Строение и свойства фульвовых кислот. Отличия фульвовых кислот от супрамолекулярного гуминового комплекса	15
1.2. Фармацевтический анализ фульвовых кислот. Проблемы и особенности, отличия фульвовых и гуминовых кислот	19
1.3. Особенности разделения фульвовых и гуминовых кислот в процессе извлечения из торфа	23
1.4. Фульвовые кислоты как потенциальные активные фармацевтические субстанции при разработке новых лекарственных форм	27
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 (ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ)	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Объекты, материалы и методы исследования	30
2.2. Выделение гуминовых производных из торфа	35
2.2.1. Кислотно-щелочная экстракция	35
2.2.2. Спиртовая экстракция.....	36
2.3. Очистка фульвовой кислоты	37
2.4. Сушка фульвовой кислоты.....	38
2.5. Регенерация колонок.....	39
2.5.1. Регенерация Supelite DAX-8	39
2.5.2. Регенерация Катионита КУ-2-8 Н ⁺	39
2.6. Криоскопическое определение молекулярной массы фульвовой кислоты	40
2.7. Разработка и приготовления трансдермальных пластырей с фульвовой кислотой	41

2.7.1. Приготовление базового состава с фульвовой кислотой.....	42
2.7.2. Приготовление модифицированного состава с Kolliphor p237.....	42
2.7.3. Приготовление модифицированного состава с Kolliphor p338.....	43
2.7.4. Приготовление модифицированного состава с диметилсульфоксидом	44
2.8. Определение высвобождения фульвовой кислоты из базового и модифицированных составов.....	45
2.9. Определение концентрации высвобожденной фульвовой кислоты	46
2.10. Исследование высвобождения с использованием диффузионной ячейки Франца	46
2.11. Определение концентрации фульвовой кислоты в исследовании высвобождения с диффузионной ячейкой Франца.....	47
2.12. Исследования биологической активности.....	48
2.12.1. Модель адьювант-индуцированного артрита	48
2.12.2. Гистопатологические исследования.....	50
2.12.3. Оценка биохимических показателей.....	51
КРАТКОЕ ОБОБЩЕНИЕ ГЛАВЫ 2.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
3.1. Получение и исследование физико-химических свойств гуминовых производных	54
3.1.1. Свойства фульвовой кислоты, полученной методом колоночной сорбции	55
3.1.2. Свойства фульвовой кислоты, полученной методом спиртовой экстракции....	59
3.1.3. Физико-химические характеристики фульвовой кислоты	61
Выводы по разделу 3.1:.....	70
3.2. Разработка эмульсионных трансдермальных пластырей с фульвовой кислотой	71
3.2.1. Основные компоненты эмульсионных основ	72
3.2.2. Разработка оптимального состава	73
3.2.3. Модификация базового состава.....	75

3.2.4. Исследование высвобождения фульвовой кислоты из трансдермальных пластырей	77
3.2.5. Исследование высвобождения фульвовой кислоты из трансдермальных пластырей с использованием диффузионной ячейки Франца	80
Выводы по разделу 3.2:.....	81
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	82
ГЛАВА 4. ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ	83
4.1. Установление подлинности фульвовой кислоты	83
4.2. Количественное определение фульвовой кислоты	85
4.3. Методики определения примесей фульвовой кислоты	88
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ	90
5.1. Исследование антиоксидантной активности фульвовой кислоты на модели адьювант-индуцированного артрита на крысах	91
5.2. Исследование противовоспалительной активности фульвовой кислоты на модели адьювант-индуцированного артрита на крысах	94
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	102
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	126
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	131
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	135
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	142
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	144
ПРИЛОЖЕНИЕ 6	153
ПРИЛОЖЕНИЕ 7	155

ПРИЛОЖЕНИЕ 8	161
ПРИЛОЖЕНИЕ 9	163
ПРИЛОЖЕНИЕ 10	168
ПРИЛОЖЕНИЕ 11	171

ВВЕДЕНИЕ

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 [1-3] и противоопухолевые свойства [4, 5] Кроме того, для этих соединений выявлены противовирусные свойства [6, 7], в том числе активность против SARS-CoV-2 [8], и противовоспалительные свойства [9, 10].

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 [5, 11, 12], в том числе, влияя на систему комплемента [13, 14].

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, содержащим ФК и тимохинон, для лечения псориаза [15, 16]. Исследованы гели с ФК для лечения ожогов [17] и экземы [18]. 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 способен 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 [19].

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 [20-24]

Огромная роль в изучение свойств и биологической активности ГК и ФК внесли исследователи ФГБОУ ВО «Сибирского государственного медицинского университета» Минздрава России [25-32] и ФГАОУ ВО «Российского университета дружбы народов» [12, 33, 34].

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 фульвовой 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, ¹³C-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).

Акты внедрения результатов диссертационной работы приведены в приложении

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 учёных в области получения и исследования ГК и ФК. Строение и чистота полученных соединений установлены с помощью спектральных методов анализа: ИК-, ^{13}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 конференция 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, посвящённой 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.

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. Kostryukov, N.B. Melnikova // Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences. – 2023. – V. 9. – N 9. – P. 617-628. DOI: 10.36348/sjmps.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: 10.29296/25877313-2023-10-00
6. **Коннова, М.А.** Стандартизация фульвовой кислоты из торфа Нижегородской области / **М.А. Коннова**, А.А. Волков, Н.Б. Мельников // Медико-фармацевтический журнал «Пuls». – 2024. – Т. 26. – N 7 – С. 138-143. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2024-26-7-138-143

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>.

ГЛАВА 1. СВОЙСТВА ФУЛЬВОВЫХ КИСЛОТ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Строение и свойства фульвовых кислот. Отличия фульвовых кислот от супрамолекулярного гуминового комплекса

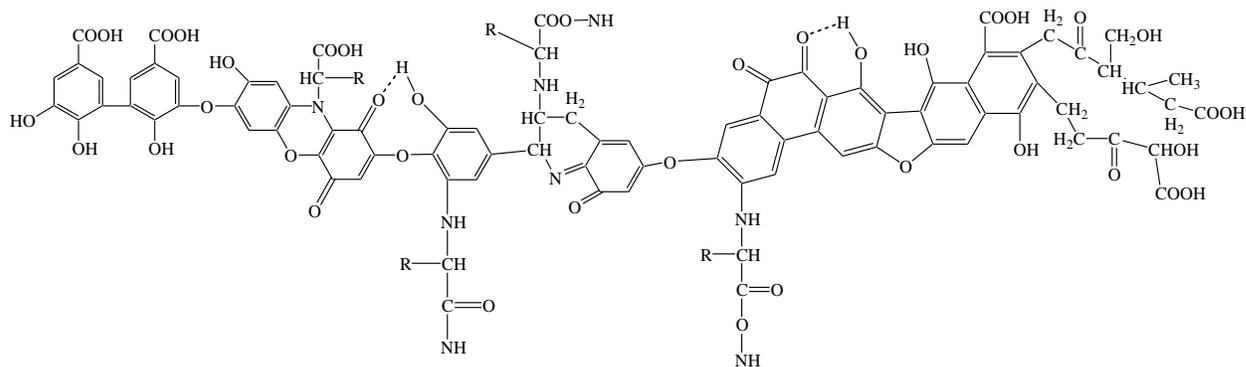
В современных исследованиях наблюдается повышенный интерес к природному возобновляемому сырью. К таким природным субстанциям относятся ГК и ФК, происходящие из остатков органических веществ в результате биологической активности микроорганизмов [35]. Широкий интерес к ГК и ФК обусловлен их разнообразным спектром биологической активности, включающим антиоксидантные [1, 2, 11, 29, 36, 37], противовоспалительные [1, 9, 10, 13, 36, 38-45], противоопухолевые [5, 46-48] и противовирусные свойства [6-8]. Способность образовывать стабильные комплексы с различными ионами металлов [49-59] также расширяет фармакологические свойства ГК и ФК.

Особое место среди ГП занимают ФК, которые исторически определяли как низкомолекулярную фракцию ГП [60-64]. Их химический состав включает в себя разнообразные функциональные группы, такие как карбоксильные, фенольные и гидроксильные группы, придающие им уникальные биологические и химические свойства. Принципиальные различия в свойствах ФК от ГК представлены в таблице 1.

Таблица 1. Принципиальные различия в свойствах ФК и ГК

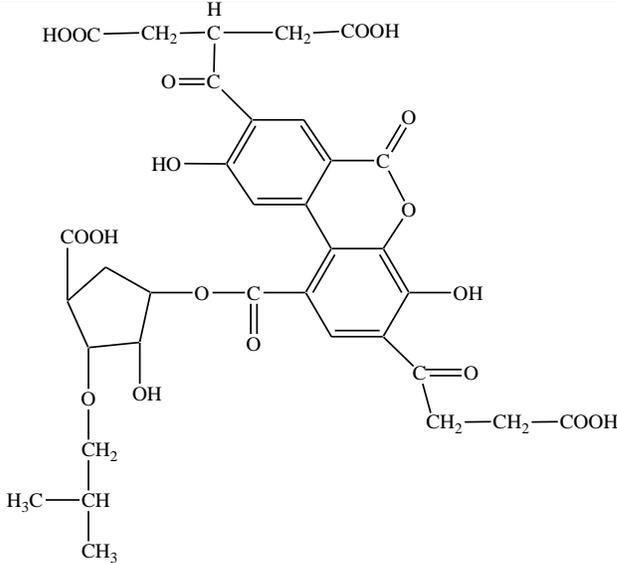
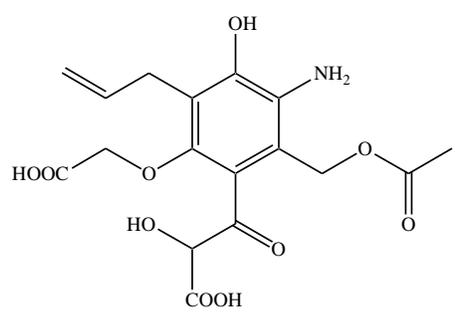
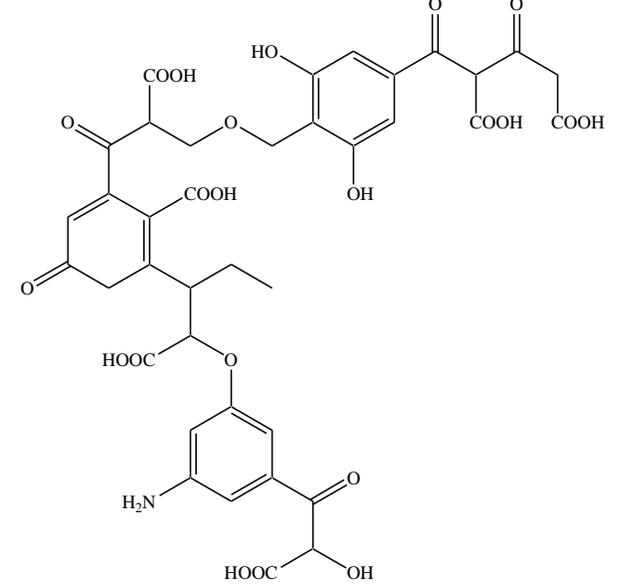
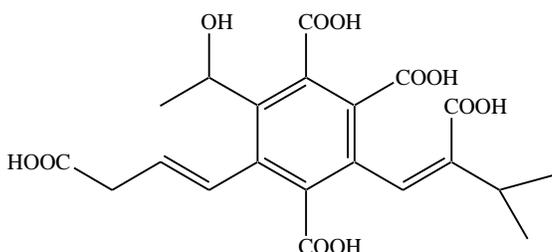
Параметры	ФК	ГК	Ссылки на литературу
Растворимость	Растворимы в воде, спирте, щёлочи, кислоте	Растворимы в щелочи, практически нерастворимы в воде, спирте, нерастворимы в кислоте	[65-67]
Молекулярная масса	До 1000 Да	Свыше 1000 Да	[68-74]
Количество кислотных групп	Выше	Ниже	[75-78]
Количество кислородсодержащих групп	Выше	Ниже	[75, 78-81]
Цвет	От светло-жёлтого до жёлто-коричневого	От тёмно-коричневого до чёрного	[82-84]

Согласно литературным данным, размеры ФК меньше, они имеют более низкую молекулярную массу, чем ГК [68-74]. В таблице 2 представлены гипотетические структуры ФК из различных источников, которые содержат ароматические и алифатические структуры, обе в значительной степени замещённые кислородсодержащими функциональными группами [71, 80, 85-88]. Они содержат в два раза больше кислорода, чем ГК (Рисунок 1), у них много карбоксильных и гидроксильных групп, поэтому они гораздо более химически активны.

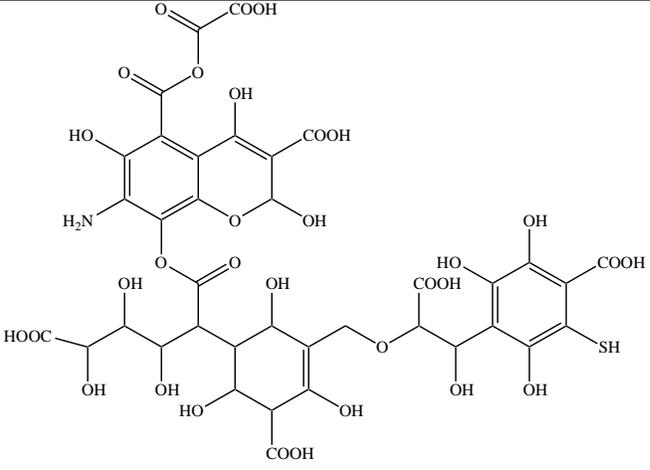
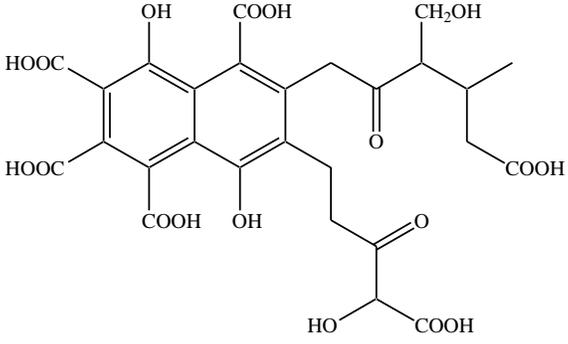
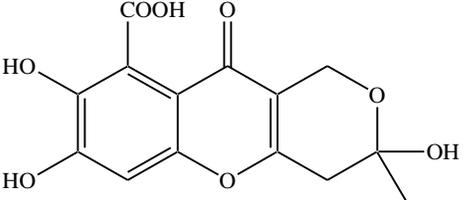
**Рисунок 1.** Гипотетический фрагмент ГК [60-62]

В свою очередь, отношение водорода к углероду в структуре ГК, равное приблизительно 1:1, подчёркивает выраженный ароматический характер молекулы [75, 81, 82]. С другой стороны, низкое отношение кислорода к углероду указывает на меньшее количество кислотных функциональных групп в ГК, чем в ФК [79, 80, 82].

Таблица 2. Гипотетические структуры ФК

 <p>Гипотетическая структура речной ФК [71]</p>	 <p>Гипотетическая структура ФК из угля [80]</p>
 <p>Гипотетическая структура ФК из угля [85]</p>	 <p>Гипотетическая структура речной ФК [86]</p>

Продолжение таблицы 2

 <p>Гипотетическая структура ФК из материала «Acros Organics» [68]</p>	 <p>Гипотетическая структура ФК из торфа и мумиё [87]</p>
 <p>Гипотетическая структура ФК из грибов <i>Penicillium sp.</i> (образцы «Sigma-Aldrich» и «Cayman Chemical Company») [88]</p>	

Огромное внимание стоит уделить структуре ФК, которая может значительно различаться в зависимости от месторождения, источника и условий образования [71, 80, 85-88] (условия разложения органических остатков, pH среды, наличие минеральных компонентов и т.д.). Кроме того, фульво-подобные структуры получают из отходов производства антибиотиков (образцы «Sigma-Aldrich», «Cayman Chemical Company») и других веществ [89-94]. Однако извлечение ФК из торфа является трудной задачей по следующим причинам:

1. Сложный состава торфа. Торф содержит разнообразные органические материалы, такие как растительные остатки, гумус и другие органические вещества. Извлечение ФК требует её отделения от других компонентов

торфа, что может быть сложным из-за их сходства в химическом составе и свойствах.

2. Низкая концентрация ФК. В торфе ФК составляют лишь небольшую часть его общего состава (0,15-10% в зависимости от месторождения), что делает их извлечение ещё более сложным. Необходимы эффективные методы концентрирования и очистки для извлечения ФК в достаточно высоких концентрациях для промышленного использования.
3. Сложность технологического процесса. Процесс извлечения ФК из торфа требует применения специализированных технологий, а также оптимизации различных этапов процесса, таких как экстракция, очистка и концентрирование.

Таким образом, разработка технологий, позволяющих одновременно извлекать как ценные ФК и ГК, а также другие биологически активные соединения из торфа, может стать ключевым направлением для создания эффективных методов переработки этого природного возобновляемого сырья. Такие технологии могут способствовать максимальному использованию потенциала торфа и обеспечению получения ценных ароматических соединений природного происхождения различной структуры и с высокой биологической активностью.

1.2. Фармацевтический анализ фульвовых кислот. Проблемы и особенности, отличия фульвовых и гуминовых кислот

В научных исследованиях, посвящённых ФК, выявляются ряд проблем, включая недостаток стандартных образцов, что ограничивает их анализ и применение. Одной из ключевых проблем является неоднородность существующих образцов [95],

обусловленная различиями в химическом составе и структуре ФК в зависимости от их происхождения и методов получения. Это создаёт сложности при калибровке и стандартизации методов анализа и может привести к несогласованным результатам. Например, доступные коммерческие образцы ФК от «Sigma-Aldrich» и «Cayman Chemical Company» полученные из грибов *Penicillium sp.* [88], что ограничивает их применение для анализа образцов ФК, извлечённых из торфа и других природных источников.

Тем не менее ведутся активные исследования по поиску путей стандартизации и анализу гуминовых производных (ГП). Большой вклад в изучение структуры ГП внесли исследователи лаборатории И.В. Перминовой и исследователи Сибирского государственного медицинского университета, впервые в России разработавшие стандартные внутрилабораторные образцы ГК [31, 96]. Кроме того, исследователи лаборатории природных гуминовых систем предложили методы анализа ГП. Одним из таких методов, позволяющим изучить весь супрамолекулярный ансамбль ГК, является масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FTICR MS) [24, 97]. Среди других методов анализа структуры ГП наиболее часто используются твердотельный ^{13}C , ^1H ЯМР, инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR), спектроскопия электронного спинового резонанса (ESR) [20, 23, 27, 30].

Атомные соотношения Н/С, О/С и N/С используются для исследования структурных изменений в ГП и для определения их структурных формул [21, 23, 24], поскольку эти показатели являются важными характеристиками степени ароматической конденсации и зрелости гуминовых веществ. Соотношение О/С является показателем содержания углеводов и карбоновых кислот в гуминовых веществах. По сравнению с ГК, высокое соотношение О/С в ФК позволяет предполагать, что ФК содержат высокую долю кислородсодержащих функциональных групп (О-алкильные и карбоновые кислоты), в то же время

соотношение N/C в ГК как правило выше, чем в ФК [98, 99]. Это также может быть подтверждено спектрами ^{13}C ЯМР, показывающие сильные сигналы углеродов в карбоксильных группах и фенольных группах ФК в более сильном поле [98, 100-102]. Инфракрасный (ИК-) анализ также даёт важную информацию об основных функциональных группах, присутствующих в гуминовых веществах, и позволяет сделать выводы об их макромолекулярной структуре. Структуры ФК сильно отличаются от ГК, и ИК-спектры подтверждают наибольшее содержание карбоксильных групп в ФК и более высокую ароматичность ГК [99, 102-105].

Количественное содержание карбоксильных, фенольных и других кислотных групп в ФК и ГК могут быть определены потенциометрическим титрованием, как обратным, так и прямым. Установлено, что общая кислотность, количество карбоксильных групп и фенольных ОН-групп выше в ФК по сравнению с ГК, при этом процентный вклад карбоксильных групп в общую кислотность выше, чем фенольных [106-110]. Другим возможным методом количественного определения для ФК и ГК может быть метод ВЭЖХ. При использовании данного метода в исследованиях на хроматограммах было выявлено два основных пика (А, В) с неполным разрешением (иногда пик А был всего лишь плечом пика В) [111]. При этом использование ВЭЖХ при анализе ГП не всегда возможно. Это связано с ограниченной растворимостью ГП, в частности ГК, ограниченной возможностью детекции образцов, отсутствием стандартных образцов ГП.

Электронные спектры поглощения спиртовых и водных растворов ГК и ФК малоинформативны, и обычно используют спектрофотометрический анализ в присутствии AlCl_3 или FeCl_3 . Спектрофлуориметрия является более распространённым методом количественного определения ГП [112-118] ввиду высокой чувствительности и высокой специфичности, по сравнению с УФ-спектроскопией. УФ-спектры ГК и ФК очень похожи, они монотонно уменьшаются с увеличением длины волны и показывают плечо или слабый пик в области коротких волн [119-121].

На спектрах возбуждения, спектрах испускания и синхронных спектрах ГК и ФК наблюдаются характерные полосы флуоресценции. Эти полосы представляют собой уникальные испускающие или возбуждающие спектральные характеристики, связанные с определенными химическими или функциональными группами в молекулярных структурах ГК и ФК.

Учитывая тот факт, что молекулярная масса и структура ГК и ФК может значительно варьировать в зависимости от сырья, состава и степени деградации торфа, количественное определение функциональных групп и структуры ГП в каждом конкретном месторождении требует своего методологического подхода. Связь молекулярной массы с функциональными группами в ГК и ФК обусловлена их сложной химической структурой.

Другой проблемой при фармацевтическом анализе ГК и ФК является их способность к агрегации в растворах. Например, карбоксильные и фенольные группы, присутствующие в ГК и ФК, за счёт водородных связей, могут образовывать различные ассоциаты в растворах с дальнейшим образованием полимерных структур и увеличению молекулярной массы этих соединений. Методом динамического светорассеивания (DLS) показано, что ГП способны к агрегации в растворах с низкой электролитической проводимостью [122-124]. Агрегация ГП может привести к потере подвижности, потере реакционной способности и в конечном итоге потере биодоступности.

Чистота образца играет ключевую роль в точности и интерпретации результатов исследований гуминового материала [101]. Разделение на более узкие фракции позволяет удалить примеси и нежелательные компоненты [19], что облегчает дальнейший анализ и экспериментальные исследования. Кроме того, чистые фракции могут быть более стабильными и однородными, что делает их более подходящими для использования в медицине и фармации.

Таким образом, анализ ГК и ФК представляет собой сложную задачу, сопряжённую с рядом трудностей и ограничений. Одной из основных проблем является ограниченность методов анализа и сложность интерпретации полученных результатов из-за гетерогенности и неопределённости структуры ГП. Отсутствие стандартизированных образцов является значительной проблемой, ограничивающей сравнение результатов между различными лабораториями и исследователями.

1.3. Особенности разделения фульвовых и гуминовых кислот в процессе извлечения из торфа

Основными преимуществами торфа как сырья для получения ГК и ФК являются практически неограниченные запасы, натуральность, дешевизна, широкое распространение на планете и доступность. При этом различный химический состав торфа создаёт ряд трудностей при отделении ГК и ФК в процессе извлечения из него, а также влияет на полноту их извлечения [125]. В течение десятилетий было трудно точно идентифицировать ФК без других компонентов, таких как минеральные соли, белки, углеводы, лигносульфонаты и другие вещества, входящие в состав торфа.

Другой проблемой, связанной с условиями извлечения, очистки сушки, является возможный полиморфизм ФК [126-128]. Данное свойство ФК может оказать значительное влияние на их использование в различных областях, таких как медицина, фармацевтика, пищевая промышленность. Например, различные кристаллические формы ФК могут иметь разные физические и химические свойства, такие как растворимость [129], стабильность, биологическая активность [130], что может существенно влиять на эффективность их использования. Именно поэтому очень важно подобрать подходящие параметры извлечения и очистки ФК.

Одним из наиболее распространённых методов выделения является экстракция, при которой ФК извлекаются из сырья с помощью растворителей, таких как вода, этиловый спирт или диметилсульфоксид [131, 132]. Этот метод довольно прост в использовании и может обеспечить высокую выходную концентрацию ФК. Однако, он может быть неэффективен для очистки от примесей и может потребовать дополнительных этапов очистки.

Основываясь на растворимости ГК и ФК при различных значениях рН, наиболее распространённым методом, используемым на сегодняшний день для извлечения ФК является кислотно-щелочная экстракция, при которой материал сначала взаимодействует с щёлочью для растворения молекул ГК и ФК, что позволяет отделить нерастворимые молекулы гумина, с последующим подкислением раствора до рН 1-2 для осаждения ГК.

В литературных данных описано, что интенсифицировать щелочную экстракцию ГП из начального сырья возможно с помощью ультразвука и микроволнового воздействия [133]. Показано значительное влияние ультразвука на повышение эффективности выделения гуминовых веществ, полученных из органического сырья, по сравнению с традиционной щелочной экстракцией.

Схема выделения гуминовых веществ методом щелочной экстракции представлена ниже, на рисунке 2.

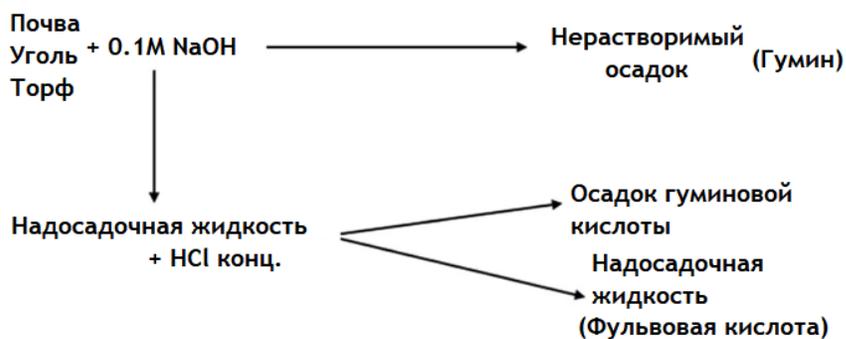


Рисунок 2. Схема щелочной экстракции гуминовых веществ из сырья [133]

Международным обществом по изучению гуминовых веществ (International Humic Substances Society; IHSS) в качестве стандартного метода получения ФК из исходного сырья был рекомендован метод Ламара [19]. Согласно этой методики, фракционирование ФК проводят на основе различного сродства к гидрофобным или гидрофильным ионообменным смолам. Для отделения ФК от других кислоторастворимых компонентов после осаждения ГК, используется колонка с неионогенной макропористой смолы на основе сложного эфира акриловой кислоты Supelite DAX-8. Благодаря селективной адсорбции, гидрофильные растворимые в кислоте компоненты не связываются со смолой и удаляются, в то время как ФК сорбируются на смоле в верхней части колонки. Для десорбции ФК используют обратное элюирование 0,1 М раствором NaOH с образованием водорастворимой натриевой соли ФК. Затем раствор натриевой соли ФК пропускают самотёком через ионообменную смолу Amberlite IR120 в водородной форме (H⁺) для её протонирования. Описанный метод не предназначен для выделения ФК из торфа, а используется в промышленности для установления и проверки состава коммерческих продуктов, содержащие ГП.

Другим путём выделения ФК, является их адсорбция активированным углём [134]. Существует несколько характеристик угля, важных для этого процесса: размер частиц угля, площадь поверхности, хемосорбированный кислород, твёрдость, однородность и структура пор. Уголь F-400, который имеет больший средний размер пор и большую площадь поверхности, чем F-200, показал лучшую сорбцию ФК в исследованиях [135].

Сама процедура осуществляется в несколько этапов [135-137]. Сначала происходит очистка активированного угля. Для этого уголь слоем 3-4 сантиметра помещается в бюхнеровскую воронку и промывается 0,1 М раствором NaOH, чередуясь с ацетоном. Затем уголь промывают 0,1 М раствором HCl и водой очищенной. Когда уголь готов к использованию, через него пропускают раствор ФК,

полученный после кислотнo-щелoчной экстракции первоначального субстрата и отделения гумина и ГК. Очистка ФК на угле осуществляется с использованием 0,1 М раствора HCl и ацетона [136, 137]. В ходе этого процесса происходит удаление прочих кислоторастворимых компонентов из первоначального раствора ФК. После очистки ФК десорбируются промыванием угля 0,5 М раствором NaOH. Полученную натриевую соль ФК нейтрализуют соляной кислотой для получения раствора ФК и сушат. Однако из-за введения высоких концентраций ионов Na⁺ в процессе экстракции трудно получить чистые ФК этим методом.

Таким образом, на сегодняшний день не существует прямого метода для разделения и характеристики ГК и ФК [138]. Все попытки охарактеризовать их или определить количество являются приблизительными оценками, и поэтому разработать стандартный метод достаточно сложно. Это связано с тем, что разные образцы из различных месторождений, источников или даже добываемых слоёв внутри одного месторождения имеют различное соотношение ГК и ФК [139]. Кроме того, ГК и ФК – это термины, являющиеся обобщающими понятиями, относящиеся не к определённым химическим соединениям, а объединяют в себе множественное число ГК и ФК. Существует большое разнообразие комплексов ФК и комплексов ГК, включающие в себя различные смеси нескольких молекул с различными функциональными группами и молекулярными массами. При выборе методики извлечения и очистки ФК приоритетом является достижение высокой степени чистоты и концентрации продукта, обеспечение эффективности и простоты процесса, а также оптимизация экономических и экологических параметров.

1.4. Фульвовые кислоты как потенциальные активные фармацевтические субстанции при разработке новых лекарственных форм

В настоящее время существует необходимость в поиске низкомолекулярных ароматических соединений природного происхождения, обладающих хорошей растворимостью в воде и высокой биологической активностью [140]. ФК является одним из таких соединений, которое привлекает внимание исследователей за счёт своих потенциальных фармакологических свойств (антиоксидантные, противовоспалительные, иммуномодулирующие и антибактериальные эффекты). Эти свойства делают ФК перспективным кандидатом для применения в медицине, фармации, косметологии и других областях. Кроме того, ФК, входящие в состав мумиё, издавна используются как часть традиционной медицины в азиатских странах [141].

Сегодня активно проводятся исследования, направленные на оценку возможных медицинских применений ФК. Так, в ходе экспериментов в Южной Корее был проведён анализ эффективности кремов, содержащих ФК в концентрациях 1%, 2%, 5% и 10%, на различные показатели человеческой кожи [142]. Отмечено, что область регенерации эпидермальных кератиноцитов увеличилась на 40%, в том числе исследована способность ФК постепенно нейтрализовать свободные радикалы [142].

Исследование по оценке безопасности и терапевтической эффективности местного применения ФК оценивались при лечении экземы [18]. Также было проведено исследование, нацеленное на оценку безопасности и терапевтической эффективности местного применения ФК в составе крема при атопических реакциях, в сравнении с кремами, содержащими 1% гидрокортизона и плацебо. [45]. В ходе исследования было выявлено, что крем с ФК, обладает способностью подавлять воспалительные реакции уже через 15 минут после применения, проявляя действие

аналогичное гидрокортизону [45]. Наногели с ФК и тимохиноном в исследованиях успешно зарекомендовал себя в терапии псориаза [15, 16] и при лечении ожогов [17]. Все эти результаты свидетельствуют о потенциальной эффективности ФК для местного применения в лечении воспалительных дерматозов и подтверждают их приемлемую безопасность.

Несмотря на многочисленные положительные эффекты ФК, показанные в гелях, данная лекарственная форма не лишена недостатков. В частности, в состав гелей необходимо вводить большее количество вспомогательных веществ, например, консервантов и стабилизаторов, предотвращающих быстрое окисление ФК как фенольных соединений при их хранении и использовании. Во-вторых, ФК в жидких средах способны к агрегации и образованию более крупных частиц, что также снижает стабильность геля. Более того, форма пластыря удобнее при лечении хронических воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит [143, 144].

Таким образом, трансдермальные пластыри могут стать хорошей альтернативой гелям, в которых ФК более стабильны при хранении, поскольку не склонны к окислению и агрегации в отсутствие растворителя.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 (ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ)

Таким образом, можно отметить, что:

1. ГК и ФК являются природными возобновляемыми веществами, важными для медицины и фармации, как компоненты препаратов противовоспалительного, иммуномодулирующего, антиоксидантного и других видов действия.
2. ФК являются более перспективными субстанциями, чем ГК, поскольку обладают лучшей гидрофильностью, меньшей молекулярной массой, большей кислотностью, лучшей растворимостью и биодоступностью.
3. Необходимой частью исследований ФК как потенциальной активной фармацевтической субстанции является изучение полиморфных форм ФК и поиск эффективных методов получения нужной полиморфной формы.
4. Отсутствие унифицированных подходов к валидации и стандартизации методов идентификации, количественного определения ФК, стандартных образцов создаёт проблемы при разработке методов анализа ФК, извлечённых из различных источников.

Включение ФК в состав трансдермальных пластырей позволяет решить проблему стабильности этой субстанции в ЛФ, поскольку ФК в гидрофильных ЛФ легко окисляется и агрегирует в водной среде.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материалы и методы исследования

Торф различных месторождений Нижегородской области (Борский район, Богородский район, Тоншаевский район) для анализа содержания ФК был получен от различных фирм-поставщиков (ООО «Виталити», ООО «Экторф», ООО «ЭССОН»). Заготовка торфов проводилась в летний период на торфяных месторождениях «Большое Пикинское», Керженское месторождение, «Большое Крашевское», «Альцевский Мох». Торф был предварительно измельчён и просеян фирмами-производителями и фирмами-поставщиками. Были получены следующие результаты по содержанию ФК (Таблица 3):

Таблица 3. Содержание ФК в различных образцах низинного торфа Нижегородской области

Месторождение торфа	«Большое Пикинское» (Борский район)	Керженское месторождение (Борский район)	«Большое-Крашевское» (Богородский район)	«Альцевский Мох» Тоншаевский район)
Содержание ФК, %	5,2±0,1	6,2±0,1	3,9±0,2	8,1±0,2

В дальнейшем ФК и ГК получали из низинного торфа (Н.Т.) месторождения «Альцевский Мох» Тоншаевского районов (Нижегородская область, ООО «ЭССОН»), свойства которого приведены в таблице 4. 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). Испытания на тяжёлые металлы при заготовке

торфа проводились по ГОСТ Р 53218-2008. Пробы торфа отбирались, согласно ГОСТ Р 54332-2011. Протоколы испытаний торфа от фирмы-производителя и фирмы-поставщика представлены в приложении 2.

Таблица 4. Свойства торфа. С, Н, О, N, S, P указаны в % от сухого образца, свободного от неорганических примесей.

	Элемент/соединение, % (в/в)							
	H ₂ 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 [145]; (*International Humic Substances Society Products, 2022-2024*)

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

Натрия гидроокись («ЧДА», ГОСТ 4328-77, АО «Башкирская содовая компания»), серная кислота («ХЧ», ГОСТ 4204-77), вода очищенная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды «Elix 3» с картриджем Progard («Millipore», France), удельное сопротивление менее 0,2 мкСм с рН 5.5 при температуре 20±10С использовались без предварительной очистки и какой-либо обработки, этанол 95 % (C₂H₆O, ГОСТ 51652-2000), Supelite DAX-8 («Sigma-Aldrich»), Катионит КУ-2-8-чС Н-форма (ГОСТ 20298-74, ООО «НеваРеактив»), Remulen TR-1 NF Polymer («Lubrizon»), эмульсионный воск (ТУ 20.41.42-029-00333865-2018 изд.№1 с изм.№1, АО «Русолеохим»), канделильский воск («Ataman Chemicals», CAS 8006-44-8), цетиловый спирт («Echo Chem Sdn. Bhd.», FALP 19111-172N), пропиленгликоль (ООО «СотСнаб»), поливинилпирролидон PLASDONE K-25 («Ashland», CAS 9003-39-8), глицерин («Ч», ГОСТ 6259-75 изм. 1,2, АО «Реахим»), полиэтиленоксид-400 (ТУ 2226-061-05766801-2006, ООО «Импэкспро»), полиэтиленоксид-1500 (ТУ 2483-167-05757587-2000, ООО «ЛДХим»), триэтаноламин (ТУ 2423-168-00203335-2007, изм. 1, 2, ООО

«Импэкспро»), поливинилпирролидон PLASDONE K-17 («Ashland», CAS 9003-39-8), твин-80 (ТУ 6-14-938-79, ООО «ХимПитерТорг»), ксантановая камедь (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия), полоксамер Kolliphor p237 («Sigma-Aldrich»), полоксамер Kolliphor p338 («Sigma-Aldrich»), диметилсульфоксид («ХЧ», ТУ 2635-114-44493179-08, АО «Экос-1»), лецитин соевый Lipoid S 75 («Lipoid GmbH»), мембрана из ацетата целлюлозы (ОЕ 67, 0,45 мкм, 25 мм, Cytiva Whatman, Великобритания).

Методы исследования и приборы

ИК-спектры получены на инфракрасном спектрофотометре с преобразователем Фурье «IRAffinity-1S» (Shimadzu, Киото, Япония) в области 4000-500 см⁻¹ в виде смесей с KBr.

Регистрация твердотельных спектров ¹³C ЯМР была выполнена на спектрометре JNM-ECX400 (JEOL, Токио, Япония – 9.39 Т, 100.5 МГц) в твёрдой фазе при комнатной температуре с применением техники кросс-поляризации и вращения под магическим углом (совмещённый CP-MAS эксперимент) с частотой вращения 10 кГц в 4 мм роторах из диоксида циркония. Важно добиться высокой однородности частиц исследуемого объекта по размеру, чтобы ротор был хорошо отцентрирован с целью достижения необходимой скорости вращения. Магический угол вращения образца (MAS) определяли при скорости вращения 6 кГц использованием стандартного образца KBr. Использовали метод развязки CW (Continuous Wave, непрерывное облучение радиочастотным полем). Использовали кросс-поляризацию с переменной амплитудой VACP, метод RAMP-CP. В качестве реперного образца использовали алмаantan (29,5 м.д.), настройку разрешения проводили также по нему. Все CP-MAS эксперименты проводились при комнатной температуре; протонную развязку осуществляли с помощью двойной импульсной модуляцией фазы (TRPM). Длительность 90°-ного импульса для ядер ¹³C составила 2.93 мкс и определялась с использованием образца гексаметилбензола. Общее количество сканов – 4096.

Спектры записывались с использованием программы Delta 4.3.6, обрабатывались с помощью ACD/NMR Processor Academic Edition, Ver. 12.01.

С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) была изучена морфология образцов на микроскопе JSM-IT300LV (JEOL, Токио, Япония) с диаметром электронного зонда около 5 нм и током зонда ниже 0,5 нА (рабочее напряжение 20 кВ). Топография поверхности порошков изучалась с использованием низкоэнергетических вторичных электронов и обратно рассеянных электронов в режиме низкого вакуума для устранения заряда.

Элементный анализ проводили: 1) на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-7000 (Shimadzu, Киото, Япония) с использованием ламп полого катода и стандартных образцов. Образцы обрабатывали смесью концентрированных кислот $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4$ (6:1) для высвобождения металлов (мокрая минерализация); 2) атомно-эмиссионной спектроскопией с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) на спектрометре Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs, Hudson, NH, США).

Определение содержания тяжёлых металлов в полученной ФК проводили, согласно ОФС.1.5.3.0009.15.

Спектры флуоресценции были записаны на спектрофлуориметре СМ 2203 (Solar, Минск, Республика Беларусь). Одномерные спектры возбуждения регистрировали в диапазоне 300–500 нм при фиксированной длине волны испускания $\lambda_{\text{Em}}=520$ нм. Одномерные спектры испускания снимали в диапазоне длин волн 400–550 нм при постоянной длине волны возбуждения $\lambda_{\text{Ex}}=360$ нм.

Распределение частиц по размерам в растворе определяли с помощью динамического рассеяния света на анализаторе размера частиц Nanowin (ООО «Микротрак», Санкт-Петербург, Россия).

Дзета-потенциал измеряли с помощью анализатора дзета-потенциала Zetachek (ООО «Микротрак», Санкт-Петербург, Россия).

pH растворов измеряли рН-метром «Эксперт-рН» (ООО «Базис Групп», Санкт-Петербург, Россия).

Прямое титрование проводили в соответствии с методикой [109]: 100 мл растворов ФК (10 мг/%) титровали 0,1 М раствором NaOH и 0,1 М раствором Na₂CO₃. После каждого добавления титранта (0,2 мл) систему перемешивали до установления равновесия. Эквивалентные точки определяли по значениям рН в конце титрования карбоксильных (рН 7,0) и гидроксильных (рН 10-11) групп [109].

Обратное титрование проводили в соответствии с методикой [109]: к раствору ФК добавляли 0,1 М раствор NaOH до значения рН 12. Титрантом служил 0,1 М раствор HCl. Систему перемешивали до достижения стабильного значения рН [109].

Определение кислотных групп ацетатным методом проводили в соответствии с методикой [109]: ФК (0,01 г) обрабатывали 2 мл этанола, добавляли 10 мл 0,1М раствора ацетата натрия и 40 мл воды очищенной. Реакционные смеси перемешивали при температуре 100 °С в колбе с обратным холодильником в течение 40 мин. Осадок отфильтровывали, тщательно промывали 100 мл воды очищенной, выпавшую свободную уксусную кислоту титровали 0,05 М раствором КОН в присутствии фенолфталеина [109]. Содержание кислотных групп рассчитывали по формуле (1):

$$C^S = \frac{V(\text{KOH}) \cdot C(\text{KOH}) \cdot V_1}{m \cdot V_2} \text{ (ммол-экв/г)}, \quad (1)$$

где $V(\text{KOH})$ – объем 0,05М КОН, использованный для титрования пробы, мл;
 $C(\text{KOH})$ – концентрация раствора КОН; m – масса навески ФК; V_1 – общий объем, мл;
 V_2 – объем аликвоты, мл.

Использованы электронные аналитические весы «Shimadzu ATX-124» с $d = 0,0001$ г, Max 120 г (Shimadzu, Япония); лабораторные весы ГОСМЕТР ВЛТЭ-510 с $d = 0,01$ г, Max 510 г (Россия), центрифуга «СМ-6 (RPM×1000)» (ELMI, Латвия), стереоскопический микроскоп МБС-10 (Россия).

Для смешивания компонентов лекарственной формы и эмульгирования использован диспергатор ИКА Т 25 digital (ИКА, Германия).

2.2. Выделение гуминовых производных из торфа

ФК выделяли из низинного торфа Нижегородской области двумя методами: 1) кислотнo-щелочная экстракция; 2) спиртовая экстракция.

2.2.1. Кислотно-щелочная экстракция

К сухой торфяной навеске массой 200 г добавляли 1000 мл 0,1 М раствора NaOH, смесь нагревали при 80°C и обрабатывали ультразвуком в течение часа в ультразвуковой ванне (Сапфир - 1,3 л/2 ТТС, 35 кГц, ООО «НОВОЛАБ», Новосибирск, Россия). Полученный щелочной раствор центрифугировали при 3000 об/мин до полного выпадения нерастворимых компонентов (гумина). Надосадочную жидкость фильтровали через фильтр синяя лента. Полученный раствор представляет собой смесь натриевых солей ГК и ФК (гумат натрия – Na-ГК, фульват натрия – Na-ФК). После покапельного прибавления концентрированной H₂SO₄ до pH 1-2 при интенсивном перемешивании в осадок выпадала ГК. ФК оставалась в растворе и окрашивала его в янтарно-жёлтый цвет. Для отделения осадка ГК от раствора ФК взвесь повторно центрифугировали.

Схема выделения ГК и ФК из торфа представлена на рисунке 3.

2.2.2. Спиртовая экстракция

К сухой торфяной навеске массой 200 г добавляли 1000 мл этанола 95%, чтобы спирт полностью покрывал её. Смесь тщательно перемешивали и обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвуковой ванны (Сапфир - 1,3 л/2 ТТС, 35 кГц, ООО «НОВОЛАБ», Новосибирск, Россия) в течение 30 минут. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об/мин до полного выпадения нерастворимых компонентов (гумина, ГК). Надосадочную жидкость фильтровали через фильтр синяя лента. Полученный раствор представляет собой спиртовой экстракт ФК.

Схема выделения ГК и ФК из торфа представлена на рисунке 3.



Рисунок 3. Схема выделения гуминовых производных (ГК и ФК) из торфа

2.3. Очистка фульвово́й кислоты

Для очистки ФК от других кислоторастворимых компонентов после кислотно-щелочной экстракции мы использовали метод, рекомендованный Международным обществом по изучению гуминовых веществ (IHSS) в качестве стандартного метода выделения ФК из исходного сырья с модификацией (метод Ламара) [19].

Раствор ФК дважды фильтровали через фильтр синяя лента. Профильтрованный раствор многократно пропускали через верхнюю часть колонки, заполненной смолой Supelite DAX-8, с помощью перистальтического насоса. Сорбцию ФК в верхней части колонки наблюдали визуально по степени окрашивания смолы (по мере сорбции ФК смола приобретала коричневатый цвет верхнего слоя). После прохождения через колонку раствора ФК, колонку промывали водой очищенной до бесцветной окраски элюата. Десорбирование ФК осуществляли обратным элюированием 2000 мл 0,1М раствором NaOH с получением сильнощелочного раствора (pH~10) Na-ФК.

Для протонирования и получения очищенных ФК раствор Na-ФК пропускали самотёком через колонку, заполненную Катионитом КУ-2-8 H⁺. Выбор данной смолы вместо Amberlite IR120 H⁺ обусловлен большей кислотностью и сорбционной активностью Катионита КУ-2-8 H⁺. Данный приём позволяет снизить себестоимость процесса и повысить его эффективность. Этапы прохождения ФК через колонки представлены на рисунке 4.

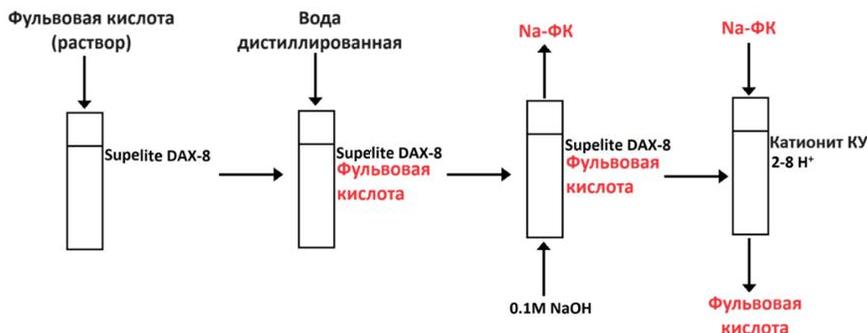


Рисунок 4. Схема очистки ФК по модифицированному методу Ламара

2.4. Сушка фульвовой кислоты

Очищенный по методу Ламара раствор ФК подвергли двум методам сушки: лиофильная сушка и вакуумная сушка.

После лиофильной сушки (от -80 до -40°C в течение 8 ч – LGJ-10, Vikumer, Пекин, Китай) был получен образец светло-коричневого цвета, имеющий вид воздушных игольчатых пластинок, с растворимостью 3,3 мл воды на грамм (легко растворима в воде, *ОФС.1.2.1.0005.15*).

После сушки под вакуумом (1 мм.рт.ст., 50°C в течение 6 ч – Smart Evaporator K4, BioChromato, Фудзисава, Япония) был получен образец в виде светло-коричневых прозрачных пластинок, с растворимостью 12,5 мл воды на грамм (растворима в воде, *ОФС.1.2.1.0005.15*).

Спиртовой экстракт ФК подвергли конвекционной сушке ($100\pm 5^{\circ}\text{C}$ – ШС-10-02 СПУ, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Смоленск, Россия). После сушки в сушильном шкафу был получен образец, имеющий вид спёкшихся пластинок тёмно-коричневого цвета, с растворимостью 666,7 мл воды на грамм (мало растворима в воде, *ОФС.1.2.1.0005.15*).

Физико-химические характеристики полученных ФК соответствовали литературным данным:

ИК – спектры, ν , cm^{-1} , (KBr): 3394 (гидроксил в карбоксильных, спиртовых и фенольных группах), 2937, 2920, 2850 (CH_3 -, CH_2 -, $-\text{CH}-$), 1716 ($\text{C}=\text{O}$ в карбонильных группах), 1608 ($\text{C}=\text{O}$ в карбоксильных группах), 1280 ($\text{C}-\text{O}$ в фенольном гидроксиде).

^{13}C ЯМР спектры, δ , м.д. для атомов углерода: 17.84 и 29.27 (алифатические), 71.86 (полуацеталь), 116.02 (олефиновые), 130.24 (ароматические), 157.00 (О-замещённые), 173.90 (карбоксильные), 198.77 (карбонильные).

2.5. Регенерация колонок

2.5.1. Регенерация Supelite DAX-8

Регенерацию смолы осуществляли 0,1 М раствором HCl путём прокачки 1000 мл через нижнюю часть колонки с помощью перистальтического насоса до тех пор, пока pH элюата не станет равным pH 1-2. Жидкость из верхней части колонки собирали с помощью патрубка. Затем колонку промывали водой очищенной до pH элюата, равного величине pH воды очищенной.

2.5.2. Регенерация Катионита КУ-2-8 Н⁺

Для регенерации Катионита КУ-2-8 Н⁺ смолу переносили из колонки в химический стакан на 1000 мл. Воду сливали, а смолу покрывали 1 М раствором HCl. При периодическом перемешивании смола отстаивалась 30 минут. После этого кислоту сливали, а смолу покрывали водой очищенной. Смолу перемешивали и отстаивали 5 минут, затем воду сливали. Данную процедуру повторяли до достижения нейтральной pH промывочной воды. Смолу возвращали в колонку и промывали водой очищенной, повторно контролируя pH элюата.

2.6. Криоскопическое определение молекулярной массы фульвовой кислоты

Определение молекулярной массы проводили с использованием термометра Бекмана [146]. После установки нулевой точки на термометре Бекмана готовили охладительную смесь, состоящую из мелкоизмельченного льда и насыщенного раствора NaCl в весовом отношении 3:1. Температуру охладительной смеси контролировали лабораторным термометром (от -1 до -2°C).

Для определения температуры замерзания растворителя (воды) в измерительную пробирку наливали 44 г воды очищенной, опускали в охладительную смесь и охлаждали до $1-2^{\circ}\text{C}$, контролируя температуру лабораторным термометром. После охлаждения растворителя, лабораторный термометр заменяли на термометр Бекмана так, чтобы резервуар с ртутью был полностью погружен в растворитель. По термометру Бекмана наблюдали за понижением температуры растворителя при перемешивании воды в пробирке движением мешалки вверх – вниз со скоростью одно перемещение в секунду. Движение мешалки осуществляли таким образом, чтобы она не соприкасалась с термометром и не поднималась выше уровня жидкости. При перемешивании растворителя в состоянии переохлаждения мешалкой, происходила кристаллизация (замерзание), сопровождающаяся выделением тепла, и температура повышалась до точки замерзания растворителя. Значение температуры фиксировали при её максимальном повышении. Измерение повторили четыре раза. По результатам проведённых опытов рассчитывали среднее значение. Температура начала кристаллизации растворителя $\Delta T_1=3,93^{\circ}\text{C}$.

Аналогично описанному выше образом определяли температуру начала кристаллизации раствора фульвовой кислоты (0,7 г фульвовой кислоты отвешивали в измерительную колбу с водой очищенной и перемешивали до растворения). Температура начала кристаллизации раствора фульвовой кислоты $\Delta T_2=3,89^{\circ}\text{C}$.

Молекулярную массу фульвовой кислоты рассчитали по формуле (2):

$$M = K \cdot \frac{1000 \cdot m_{\text{в-ва}}}{\Delta T \cdot m_{\text{воды}}} \text{ (г/моль)}, \quad (2)$$

где $K = 1,86 \text{ К} \cdot \text{кг/моль}$ – криоскопическая константа воды; $m_{\text{в-ва}}$ (г) – масса растворённого вещества; $m_{\text{воды}}$ (г) – масса растворителя; $\Delta T = \Delta T_1 - \Delta T_2 = 3,93^\circ\text{C} - 3,89^\circ\text{C} = 0,04^\circ\text{C}$ – понижение температуры кристаллизации раствора (определили экспериментальным путём).

2.7. Разработка и приготовления трансдермальных пластырей с фульвовой кислотой

В работе была использована методология компьютерного моделирования Response Surface (RSM) для разработки и оптимизации составов трансдермальных пластырей. Мы изучили параметры оптимизации, используя данные, полученные в ходе эксперимента. Независимыми переменными являлись концентрации полимера (ксантана), концентрации пластификатора (глицерина), концентрации плуроников Kolliphor p237 и Kolliphor p338, концентрации эмульсионного воска, которые варьировались на двух уровнях (низком и высоком). Зависимыми переменными были такие физические параметры как время высыхания пластыря, толщина пластыря, прочность пластыря. Пробные варианты трансдермальных пластырей были подготовлены в соответствии с предложенным программой дизайном. Программное обеспечение Minitab Statistical Software использовалось для создания и оценки дизайна эксперимента. Результаты ANOVA показали, что эти модели были значимыми. Трёхмерные графики поверхности и соответствующие им контурные графики для оценки влияния независимых переменных (факторов) на каждый исследованный параметр представлены в приложении 3.

2.7.1. Приготовление базового состава с фульвовой кислотой

А) В химическом стакане объёмом 150 мл растворили ФК (0,016 г) в воде очищенной (2 мл). В полученном растворе растворили ПВП К-17 (0,5 г), ПЭО-400 (0,02 г). ПЭО-1500 (0,2 г) растворили при нагревании.

Б) В другом химическом стакане объёмом 150 мл смешивали ксантан (0,1 г), глицерин (0,5 г), воду очищенную (5 мл) до образования прозрачного однородного геля.

В) К гелю ксантана (Б) добавили раствор ФК (А) и перемешивали до получения прозрачного, однородного геля коричневого цвета. К полученному гелю (В) последовательно добавляли Твин-80 (0,14 г) и расплавленный эмульсионный воск (0,1 г) при нагревании на водяной бане. Нагретую массу переносили на подложку и отправляли на сушку в сушильный шкаф, разогретый до 50°C до получения плёнки. Технологическая схема приготовления трансдермального пластыря базового состава представлена в приложении 4.

Взвешивание всех ингредиентов проводили на аналитических весах ($\pm 0,0001$).

2.7.2. Приготовление модифицированного состава с Kolliphor p237

А) В химическом стакане объёмом 150 мл растворили ФК (0,016 г) в воде очищенной (2 мл), добавляли Kolliphor p237 (0,1 г), перемешали до растворения.

Б) В полученном растворе (А) растворили ПВП К-17 (0,5 г), ПЭО-400 (0,02 г). ПЭО-1500 (0,2 г) растворили при нагревании.

В) В другом химическом стакане объёмом 150 мл смешивали ксантан (0,1 г), глицерин (0,44 г), воду очищенную (5 мл) до образования прозрачного однородного геля.

Г) К гелю ксантана (В) добавляли раствор ФК (Б) и перемешивали до получения прозрачного, однородного геля коричневого цвета. К полученному гелю (Г) последовательно добавляли Твин-80 (0,14 г) и расплавленный эмульсионный воск (0,1 г) при нагревании на водяной бане. Нагретую массу переносили на подложку и отправляли на сушку в сушильный шкаф, разогретый до 50°C до получения плёнки.

Взвешивание всех ингредиентов проводили на аналитических весах ($\pm 0,0001$).

2.7.3. Приготовление модифицированного состава с Kolliphor p338

А) В химическом стакане объёмом 150 мл растворяли ФК (0,016 г) в воде очищенной (2 мл), добавляли Kolliphor p338 (0,085 г), перемешали до растворения.

Б) В полученном растворе (А) растворяли ПВП К-17 (0,5 г), ПЭО-400 (0,02 г), ПЭО-1500 (0,2 г) растворили при нагревании.

В) В другом химическом стакане объёмом 150 мл смешивали ксантан (0,1 г), глицерин (0,45 г), воду очищенную (5 мл) до образования прозрачного однородного геля.

Г) К гелю ксантана (В) добавляли раствор ФК (Б) и перемешивали до получения прозрачного, однородного геля коричневого цвета. К полученному гелю (Г) последовательно добавляли Твин-80 (0,14 г) и расплавленный эмульсионный воск (0,1 г) при нагревании на водяной бане. Нагретую массу переносили на подложку и отправляли на сушку в сушильный шкаф, разогретый до 50°C на 1 сутки до получения плёнки.

Взвешивание всех ингредиентов проводили на аналитических весах ($\pm 0,0001$).

2.7.4. Приготовление модифицированного состава с диметилсульфоксидом

А) В химическом стакане объёмом 150 мл растворяли ФК (0,016 г) в воде очищенной (2 мл), добавляли диметилсульфоксид (0,035 г), перемешивали до растворения.

Б) В полученном растворе (А) растворяли ПВП К-17 (0,5 г), ПЭО-400 (0,02 г), ПЭО-1500 (0,2 г) растворили при нагревании.

В) В другом химическом стакане объёмом 150 мл смешивали ксантан (0,1 г), глицерин (0,5 г), воду очищенную (5 мл) до образования прозрачного однородного геля

Г) К гелю ксантана (В) добавили раствор ФК (Б) и перемешали до получения прозрачного, однородного геля коричневого цвета. К полученному гелю (Г) последовательно добавляли Твин-80 (0,14 г) и расплавленный эмульсионный воск (0,1 г) при нагревании на водяной бане. Нагретую массу переносили на подложку и отправляли на сушку в сушильный шкаф, разогретый до 50 °С на 1 сутки до получения плёнки.

Взвешивание всех ингредиентов проводили на аналитических весах ($\pm 0,0001$).

2.8. Определение высвобождения фульвовой кислоты из базового и модифицированных составов

Определение скорости высвобождения ФК из базового и модифицированных составов через ацетилцеллюлозную мембрану проводили согласно *ОФС.1.4.2.0017.15 Растворение для трансдермальных пластырей*.

В химический стакан объёмом 1000 мл помещали держатель для трансдермального пластыря с закреплённым в нём образцом высвобождающей поверхностью вверх. В качестве среды высвобождения использовали воду очищенную при температуре $(32,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Отбор проб осуществляли в течение 10 ч каждые 15 мин, каждые 30 мин, каждые 60 мин.

Спектрофлуориметрию использовали для оценки высвобождения ФК из трансдермальных пластырей. Количество ФК рассчитывали с использованием градуировочного графика зависимости концентрации ФК от относительной интенсивности флуоресценции. Спектр возбуждения ФК, снятый в диапазоне 300-500 нм при длине волны испускания $\lambda_{\text{Em}}=520$ нм, имел полосу при 360 нм.

Статистическую обработку результатов осуществляли согласно *ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента*, используя программу Microsoft Office Excel 2021 (Приложение 5).

2.9. Определение концентрации высвобожденной фульвовой кислоты

Определение концентрации ФК в пробах проводится методом спектрофлуориметрии по спектру возбуждения, снятому в диапазоне 300-500 нм при длине волны испускания $\lambda_{Em}=520$ нм. Спектр имел полосу при 360 нм.

Навеску 0,1 г ФК помещали в мерную колбу объемом 100 мл, доводили объем раствора дистиллированной водой до метки, перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали. Из полученного раствора была приготовлена серия градуировочных растворов методом объемного разбавления. Концентрации градуировочных растворов и градуировочный график представлены в приложении 6.

2.10. Исследование высвобождения с использованием диффузионной ячейки

Франца

Исследование высвобождения ФК через ацетилцеллюлозную мембрану проводили с использованием диффузионной ячейки Франца объемом 4,35 мл в условиях, близких к физиологическим, при температуре 37°C. В качестве среды высвобождения использовали фосфатный буфер с pH 7,4. Для исследования использовали ацетилцеллюлозную мембрану ($d=0,45$ мкм) площадью 1,3 см².

Брали навески образцов со следующей массой:

- Базовый состав – 0,0621 г от 0,6246 г;
- модифицированный состава с Kolliphor p237 – 0,0575 г от 0,8875 г;

Внутреннюю, акцепторную камеру, заполняли фосфатным буфером. Наружную камеру заполняли водой с температурой 37°C и использовали для термостатирования. Перед применением образцов диффузионной ячейке давали возможность прийти в равновесие в течение 30 минут. Образцы помещали на мембрану и проводили отбор проб микрошприцом МШ-50 АГАТ каждые 30 минут в течение 8 часов. Отобранные пробы помещали в пикнометр объёмом 5 мл и доводили объём до метки фосфатным буфером. Перемешивание раствора в акцепторной камере осуществляли при помощи магнитной мешалки.

Количество ФК рассчитывали с использованием градуировочного графика зависимости концентрации ФК от относительной интенсивности флуоресценции. Спектр возбуждения ФК, снятый в диапазоне 300-500 нм при длине волны испускания $\lambda_{Em}=520$ нм, имел полосу при 360 нм.

Статистическую обработку результатов осуществляли согласно *ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента*, используя программу Microsoft Office Excel 2021 (Приложение 7).

2.11. Определение концентрации фульвово́й кислоты в исследовании высвобождения с диффузионной ячейкой Франца

Определение концентрации ФК в пробах проводится методом спектрофлуориметрии по спектру возбуждения, снятому в диапазоне 300-500 нм при длине волны испускания $\lambda_{Em}=520$ нм. Спектр имел полосу при 360 нм.

Брали навеску 0,0016 г ФК, помещали в пикнометр на 5 мл, растворяли и доводили объём до метки дистиллированной водой. Из полученного раствора была приготовлена серия градуировочных растворов методом объёмного разбавления.

Концентрации градуировочных растворов и градуировочная кривая представлены в приложении 8.

2.12. Исследования биологической активности

В исследовании принимали участие крысы-самцы линии Вистар массой 250-300 г. Животных приобрели в Животноводческом комплексе «Андреевка» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства (Андреевка, Московская область, Россия). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания в соответствии с правилами Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивами 86/609 ESC. Проведение исследований было одобрено Заседанием Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России № 02 от 17.02.2023 (Приложение 9).

2.12.1. Модель адьювант-индуцированного артрита

Животных подвергали глубокому наркозу при внутрибрюшинном введении Золетила 100 (60 мг/кг) и Ксила (6 мг/кг). Кожу, покрывающую коленный сустав, разрезали и обнажали сухожилие надколенника. В общей сложности 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда, содержащего 0,2 мг *Mycobacterium tuberculosis*, суспендированных в 0,17 мл стерилизованного парафинового масла (Erba Lachema, Брно, Чехия), вводили через сухожилие надколенника в полость правого коленного

сустава, для развития воспаления (день 0) [147]. Крыс возвращали в клетку, давали возможность прийти в себя и ежедневно контролировали на предмет нарушений походки.

Через 15 дней после инъекции полного адьюванта Фрейнда животных разделили на три равные группы (Таблица 5) таким образом, чтобы диаметр поперечного сечения коленного хряща был эквивалентным. Диаметр суставов измеряли микрометром. Поражённый сустав при сжатии микрометром вызывал боль, о которой свидетельствовали попискивание и отдергивание лапы крысой. Пластыри накладывали на правую заднюю лапу в области коленного сустава на 8 ч два раза в день в течение 7 дней. Дозы стандартизировали путём наложения пластырей размером 1,0 см × 0,84 см, исходя из разницы между массой тела человека и массой тела крысы (Таблица 6).

Таблица 5. Группы крыс для исследования противовоспалительной активности

Положительный контроль 1	Интактные животные
Контроль 2	Крысы с клиническими признаками артрита, не получающие лечение
Базовый состав	Крысы с клиническими признаками артрита, которым накладывали пластырь с базовым составом (ФК)
Kolliphor p237	Крысы с клиническими признаками артрита, которым накладывали модифицированный состав (ФК+Kolliphor p237)

После эксперимента все крысы были убиты путём декапитации под наркозом (Золетил 60 мкг/кг, Ксила 6 мг/кг).

Таблица 6. Составы трансдермальных пластырей. Содержание ФК постоянное ($C_{ФК}=0,016$ г).

Трансдермальный пластырь	Базовый состав (БС)	Kolliphor p237
Состав, вес (г)	ФК – 0,016; Ксантан – 0,1; Глицерин – 0,5; ПВП К-17 – 0,5; ПЭО-400 – 0,02; ПЭО-1500 – 0,2; Твин-80 – 0,14; Эмульсионный воск – 0,1; Вода – 7,0	БС+Kolliphor p237 – 0,1

2.12.2. Гистопатологические исследования

Образцы правого коленного сустава крыс извлекали и фиксировали в 10% нейтральном фосфатно-буферном формалине в течение 48 ч. После этого процесса их декальцинировали в течение 2-5 суток в 5-8% забуференном растворе муравьиной кислоты при ежедневной смене декальцинирующего раствора и контроле полноты декальцинации. Образцы обезвоживали в серии этанола от 70 до 99,9%, очищали в ксилоле, помещали в парафиновые блоки и подвергали поперечному срезу толщиной 4 мкм. Окрашивание проводили гематоксилин-эозином и трихромом Массона, исследовали и фотографировали с помощью светового микроскопа (Leica DM1000; Leica Microsystems, Германия). Гистологические исследования коленного сустава включали оценку дегенерации хондроцитов, эрозии хряща/ изъязвления, фибрилляции хряща, инфильтрации синовиальной оболочки мононуклеарными клетками (– нормальный, + минимальный, ++ легкий, +++ умеренный, ++++ тяжелый).

2.12.3. Оценка биохимических показателей

Биохимические показатели получали по крови на 7-й день лечения. Кровь стабилизировали цитратом натрия (1:9). Эритроциты дважды промывали 0,9% раствором NaCl центрифугированием по 10 мин при 1600g. Интенсивность перекисного окисления липидов оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) в плазме и эритроцитах в соответствии с методами Утиямы и Михары [148]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) измеряли в эритроцитах с использованием ингибирования аутоокисления адреналина [149]. Каталазную активность определяли спектрофотометрически по разложению перекиси водорода каталазой [150]. Активность глутатионредуктазы (ГР) изучали методом спектрофотометрии по восстановлению окисленного глутатиона [151]. Энергетический обмен в эритроцитах изучали с использованием каталитической активности лактатдегидрогеназы в прямой (ЛДГ прям., субстрат — 50 мМ лактат натрия) и обратной (ЛДГ обр., субстрат — 23 мМ пируват натрия) реакциях [152]. Удельную активность ферментов рассчитывали по концентрации белка, анализируемой модифицированным методом Лоури [153]. Активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) оценивали спектрофотометрически в соответствии с предыдущими методами [154].

Для оценки интенсивности воспалительного процесса определяли общее количество лейкоцитов в крови с помощью автоматического анализатора BC-2800 Vet (Mindray; Китай) и концентрацию высокочувствительного С-реактивного белка (нг/мл) (Rat CRP ELISA Kit, Elabscience Biotechnology, Китай). Содержание ревматоидного фактора (РФ, МЕ/мл) определяли в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом с использованием Cobas 6000 («F. Hoffmann-LaRocheLtd», Швейцария) и CobasIntegra 400 («F. Hoffmann-LaRocheLtd»,

Швейцария) [155]. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) крови крыс определяли методом Панченкова [156].

КРАТКОЕ ОБОБЩЕНИЕ ГЛАВЫ 2

Таким образом, в данной главе представлены и описаны исследуемые объекты и вспомогательные материалы. Даны характеристики контрольно-аналитического оборудования с описанием методик и дизайном эксперимента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Получение и исследование физико-химических свойств гуминовых производных

ФК получали первоначальной экстракцией из торфа. Кислотно-щелочная и спиртовая экстракция торфа проводилась с использованием ультразвука (УЗ). Общая схема различных методов выделения ФК представлена на рисунке 5.

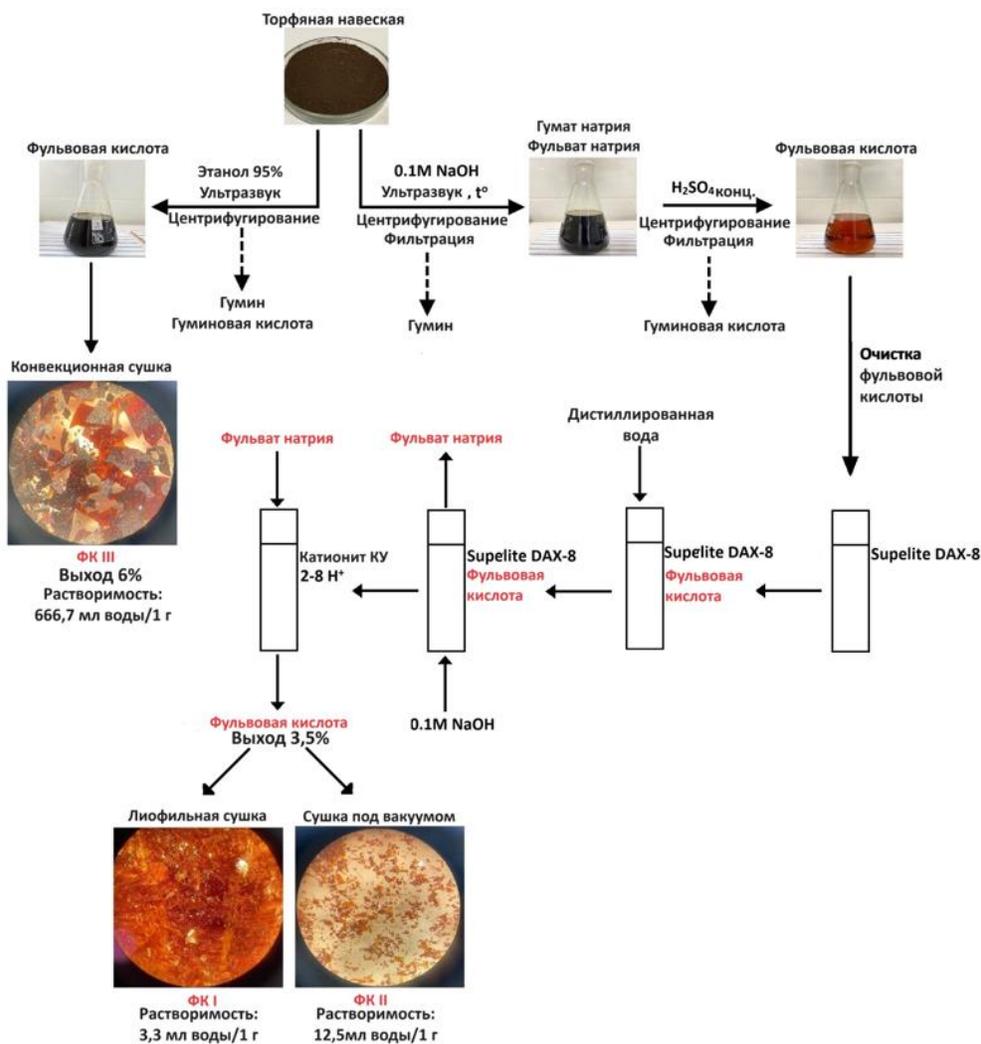


Рисунок 5. Схема методов получения ФК, используемых в работе

Торф (200 г) подвергали 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 после выпадения в осадок. Количественное содержание ФК контролировали спектрофлуориметрически (по спектру возбуждения). Для сравнения ФК экстрагировали УЗ-экстракцией из раствора этанола с многоступенчатым центрифугированием при комнатной температуре для удаления гумина и гуминовых кислот.

3.1.1. Свойства фульвовой кислоты, полученной методом колоночной сорбции

Полученные образцы ФК имели различный внешний вид (цвет, форму) в зависимости от способа выделения и сушки. На рисунках 6 и 7 представлены фотографии типичных образцов, полученных: по методу-1 – УЗ-щелочная экстракция торфа с получением ФК по модифицированному методу Ламара и последующей лиофильной сушкой (ФК I, рисунок 6); по методу-2 – УЗ-щелочная экстракция торфа с получением ФК по модифицированному методу Ламара и последующей вакуумной сушкой (ФК II, рисунок 7).

Ллиофильная сушка раствора ФК привела к получению образца (ФК I), имеющего вид воздушных игольчатых пластинок (рисунок 6). Полученная в лаборатории кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России ФК I обладает светло-коричневой окраской, легко растворима в воде, согласно *ОФС.1.2.1.0005.15 Растворимость* (3,3 мл воды на грамм).

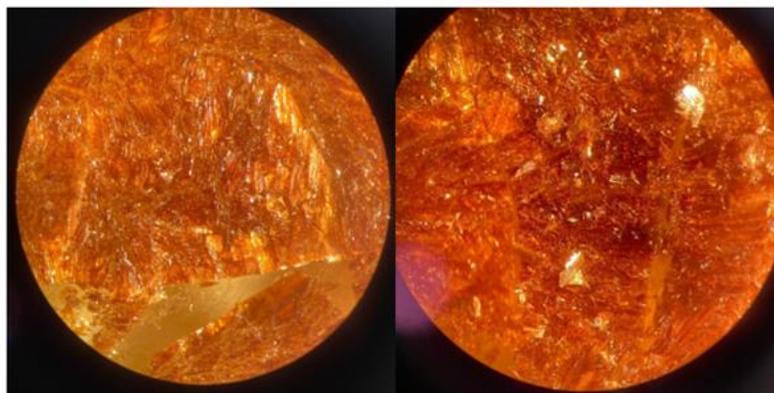


Рисунок 6. Фотографии внешнего вида ФК I при двукратном увеличении

Сушка того же раствора под вакуумом привела к получению образца (ФК II), имеющего вид прозрачных пластинок (рисунок 7). Полученная в лаборатории кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России ФК II обладает светло-коричневой окраской, растворима в воде, согласно *ОФС.1.2.1.0005.15 Растворимость* (12,5 мл воды на грамм).

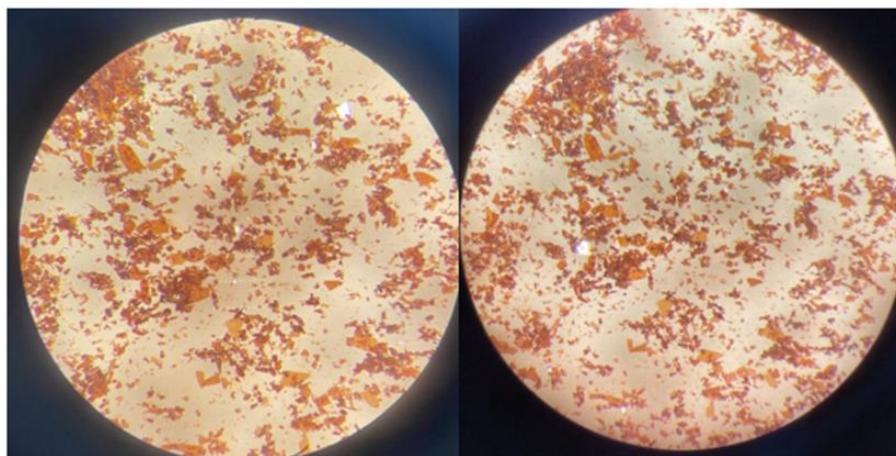


Рисунок 7. Фотографии внешнего вида ФК II при двукратном увеличении

На рисунке 8 (А-Г) и 9 (А-Г) показаны типичные СЭМ-изображения при различном приближении и EDX спектры (Д) ФК I и ФК II соответственно.

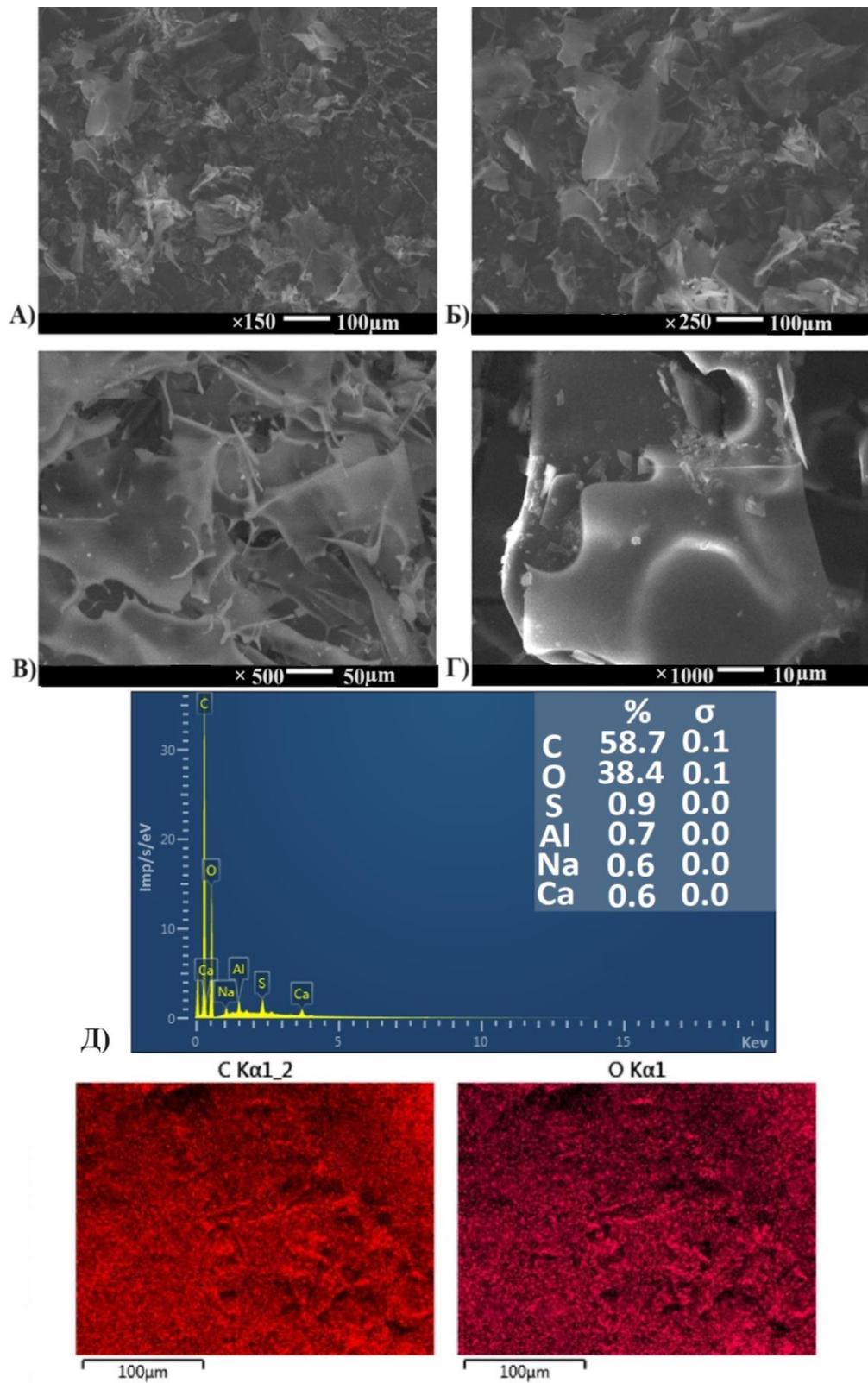


Рисунок 8. СЭМ-изображения (А – $\times 150$; Б – $\times 250$; В – $\times 500$; Г – $\times 1000$) и EDX спектр (Д) ФК I

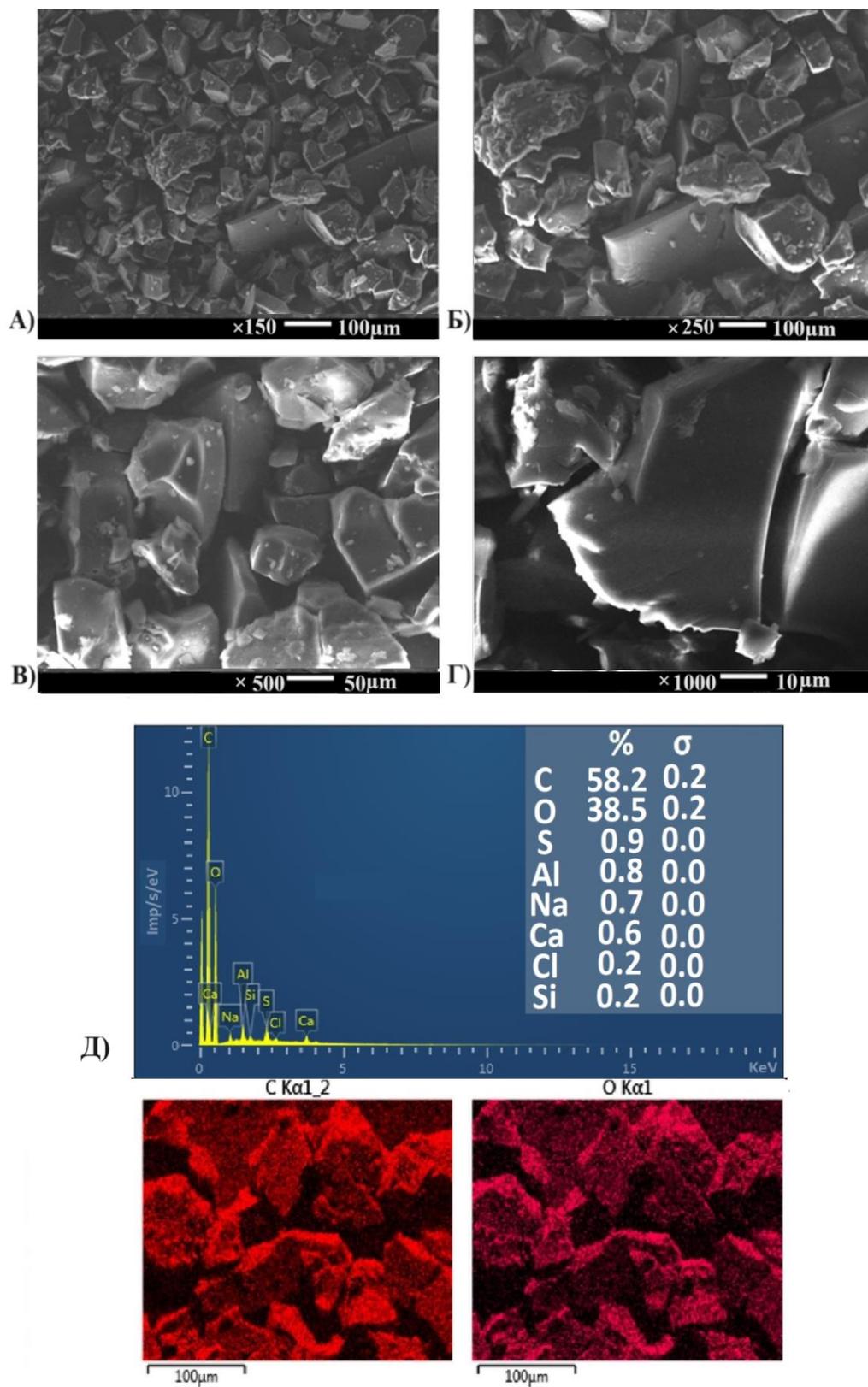


Рисунок 9. СЭМ-изображения ФК II (А – $\times 150$; Б – $\times 250$; В – $\times 500$; Г – $\times 1000$) и EDX спектр (Д) ФК II

Данные спектров EDX для ФК I и ФК II, а также распределение элементов в порошках на алюминиевой фольге характеризовали порошки как высокодисперсные с равномерным распределением элементов по всему объему, с соотношением С:О близким к 1,5.

Таким образом, ФК, полученная методом колоночной сорбции, в зависимости от метода сушки, имеет две основные структурные формы (ФК I и ФК II).

3.1.2. Свойства фульвовой кислоты, полученной методом спиртовой экстракции

Конвекционная сушка спиртового экстракта фульвовой кислоты при 100°C – метод-3, привела к получению образца (ФК III), имеющего вид тёмно-коричневых спёкшихся пластинок (рисунок 10). Полученная в лаборатории кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России ФК III обладает тёмно-коричневой окраской, мало растворима в воде, согласно *ОФС.1.2.1.0005.15 Растворимость* (666,7 мл воды на грамм).

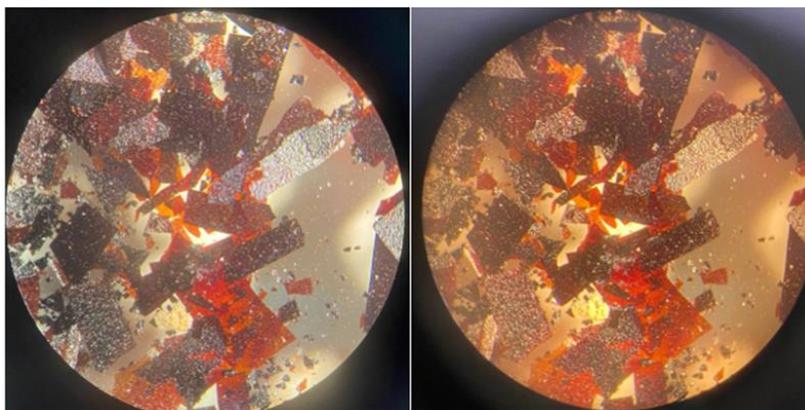


Рисунок 10. Фотографии внешнего вида ФК III при двукратном увеличении

На рисунке 11 (А-Г) показаны типичные СЭМ-изображения при различном приближении и EDX спектр (Д) ФК Ш.

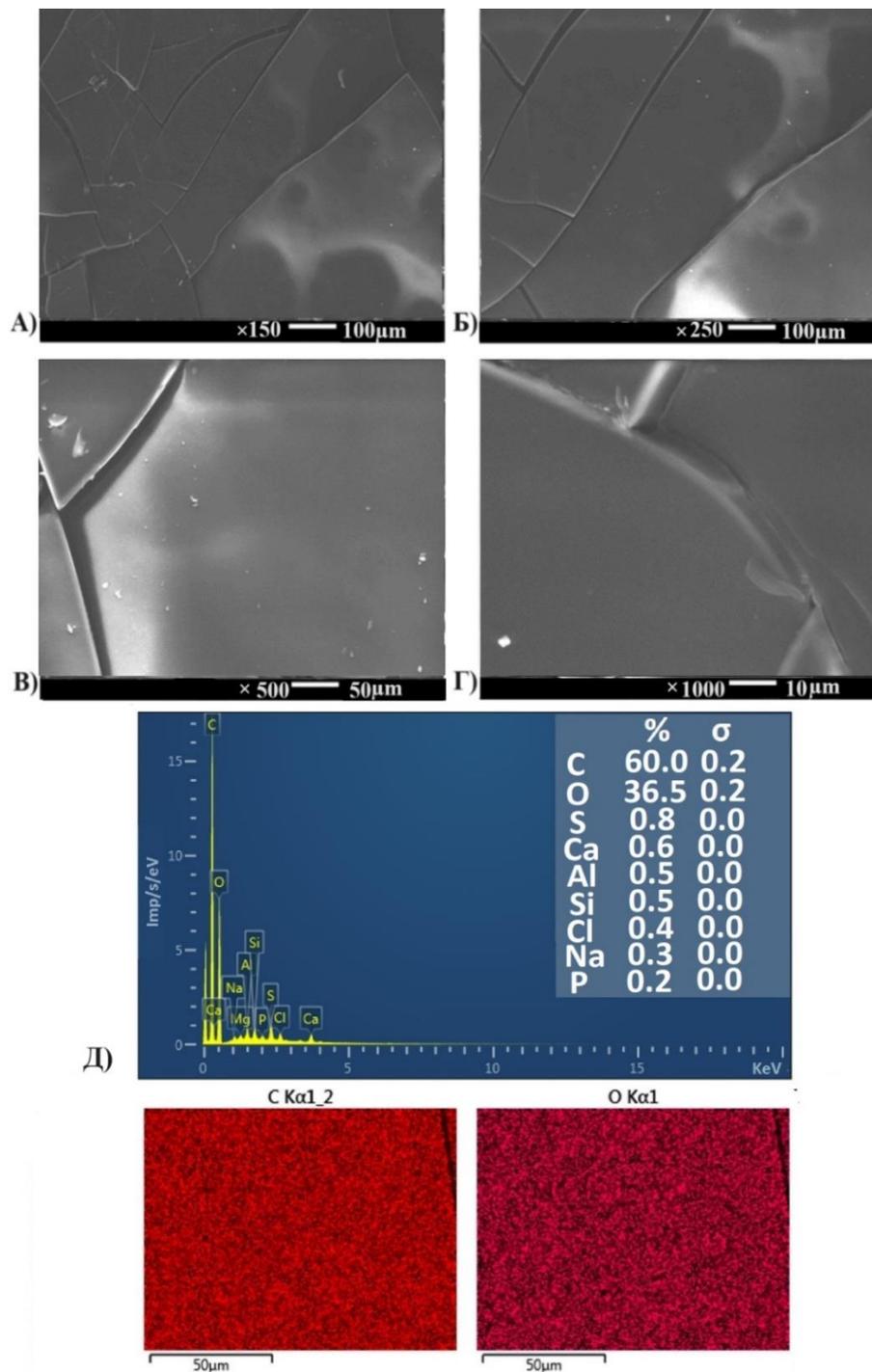


Рисунок 11. СЭМ-изображения ФК 3 (А – $\times 100$; Б – $\times 200$; В – $\times 500$; Г – $\times 1000$) и EDX спектр (Д)

Данные спектра EDX для ФК III и распределение элементов в порошках на алюминиевой фольге также характеризовали данную структурную форму как высокодисперсную с равномерным распределением элементов по всему объему, с соотношением С:О в составе, близким к 1,5.

Таким образом, ФК, полученная методом спиртовой экстракции (ФК III), имела близкий элементный состав к структурам, полученным методом колоночной сорбции (ФК I, ФК II), однако значительно отличалась от них по растворимости. Данный метод-3 обеспечивает максимальный выход ФК (6%), однако наименьший процент примесей и лучшая растворимость были достигнуты при использовании метода-1 (ФК I).

3.1.3. Физико-химические характеристики фульвовой кислоты

Анализ всех трёх образцов ФК, полученных разными методами в лаборатории кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, показал, что образцы, 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). В таблице 7 показана характеристика трёх образцов ФК.

Таблица 7. 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
Растворимость (мл воды на грамм)	3,3	12,5	666,7

Продолжение таблицы 7

С, %	56,0±2,1	56,0±2,2	59,0±1,2
О, %	38,0±2,3	38,0±2,1	36,0±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 _{av.} , 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 7). Образец ФК I характеризуется максимальным наличием полярных функциональных групп (12,0±0,05 ммоль-экв/г), большей концентрацией фенольных гидроксильных групп, более высоким значением отрицательного дзета-потенциала, который препятствует агрегации частиц. Полученные данные согласуются с данными, описанными в литературе [108-110].

Данные ИК-спектров подтверждают высокое содержание различных полярных групп в составе ФК (Рисунок 12, Таблица 8).

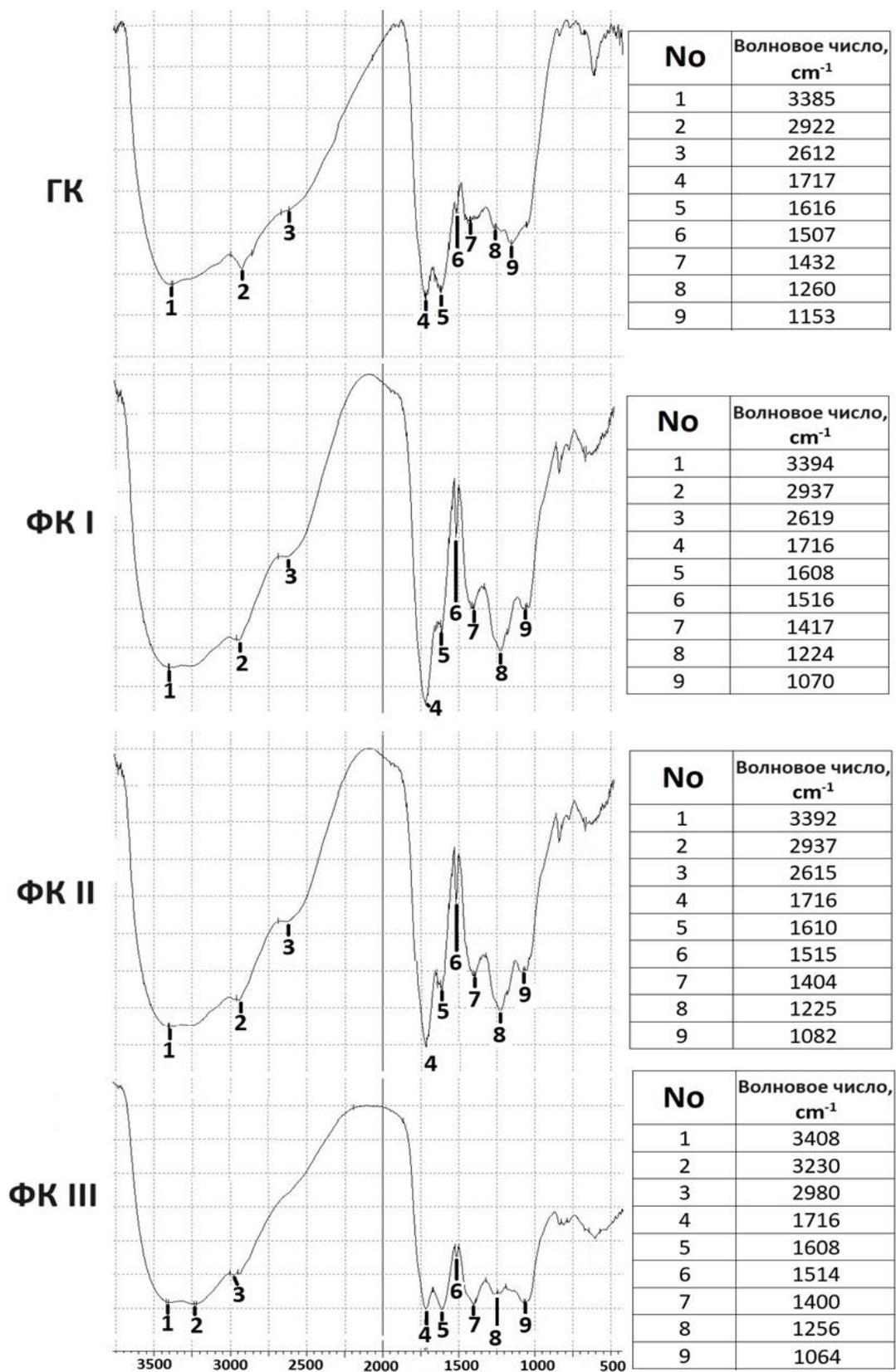


Рисунок 12. ИК-спектры гуминовых производных: ГК и трёх форм ФК

Широкая полоса поглощения в области 3600-2500 см^{-1} с максимумом в интервале 3400-3200 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям гидроксильных групп –О-Н (в составе фенолов, спиртовых и карбоксильных групп). Также в области выше 3000 см^{-1} находятся полосы валентных колебаний =СН связей ароматического кольца. Наличие полосы 1716-1717 см^{-1} обусловлено валентными колебаниями карбонильных групп С=О. Данная группа может быть представлена в основном альдегидами, кетонами, карбоновыми кислотами и их производными. Полоса при 2750-2500 см^{-1} указывает на возможную димеризацию кислотных групп. Карбоксилат-ион дает полосы антисимметричных валентных колебаний в области 1650-1550 см^{-1} и более слабую полосу, соответствующую симметричным валентным колебаниям около 1400 см^{-1} . Также в районе 1400 см^{-1} наблюдаются деформационные колебания фенольных групп О-Н. Интенсивная полоса поглощения в области, близкой к 1720 см^{-1} , а также при 1200 см^{-1} указывает на то, что фульвокислота содержит большое количество карбоксильных и карбонильных групп. На возможное присутствие эфиров и лактонов указывают антисимметричные валентные колебания 1280–1150 см^{-1} . Для характеристики структуры ФК использовалось соотношение интенсивности валентных колебаний (Т) карбоксильных групп в качестве реперной полосы к карбонильным, фенольным и спиртовым группам (Таблица 8). ГК была получена после УЗ-щелочной экстракции и осаждения H_2SO_4 .

Таблица 8. Соотношения полос пропускания ИК-спектров ГП

Соотношения полос пропускания	$T_{\text{COOH}}/T_{\text{C=O}}$	$T_{\text{COOH}}/T_{\text{Ph-OH}}$	$T_{\text{COOH}}/T_{\text{OH}}$ в спиртовых группах
	$T_{1600-1650}/T_{1716-1720}$	$T_{1600-1650}/T_{1200-1270}$	$T_{1600-1650}/T_{1020-1075}$
ФК I	2,16	1,17	0,84
ФК II	2,10	1,15	0,87
ФК III	0,99	0,66	0,81
ГК	1,05	0,69	0,68

Строение полученных продуктов подтверждено твердотельным ^{13}C ЯМР (рисунок 13). В спектрах присутствуют отчетливые сигналы, связанные с алифатическими (0–50 м.д.), ароматическими (108–165 м.д.) и карбоксильными (165–190 м.д.) атомами углерода. Кроме того, присутствуют сигналы в области 60–96 м.д., соответствующие O-замещенным атомам углерода, например, спиртовым или эфирным фрагментам. В ароматической части спектра присутствуют сигналы O-замещенных атомов углерода 160-140 м.д. и более интенсивные сигналы в области 120-140 м.д., кроме того, присутствуют сигналы 115-120 м.д., принадлежащие олефиновым атомам углерода, связанным с группой CO. Низкоинтенсивный сигнал 95-106 м.д. относится к полуацетальному углероду. Присутствие карбоксила подтверждает интенсивный сигнал в области 170-180 м.д., а наличие карбонильной группы подтверждает сигнал низкой интенсивности в районе 197-198 м.д.

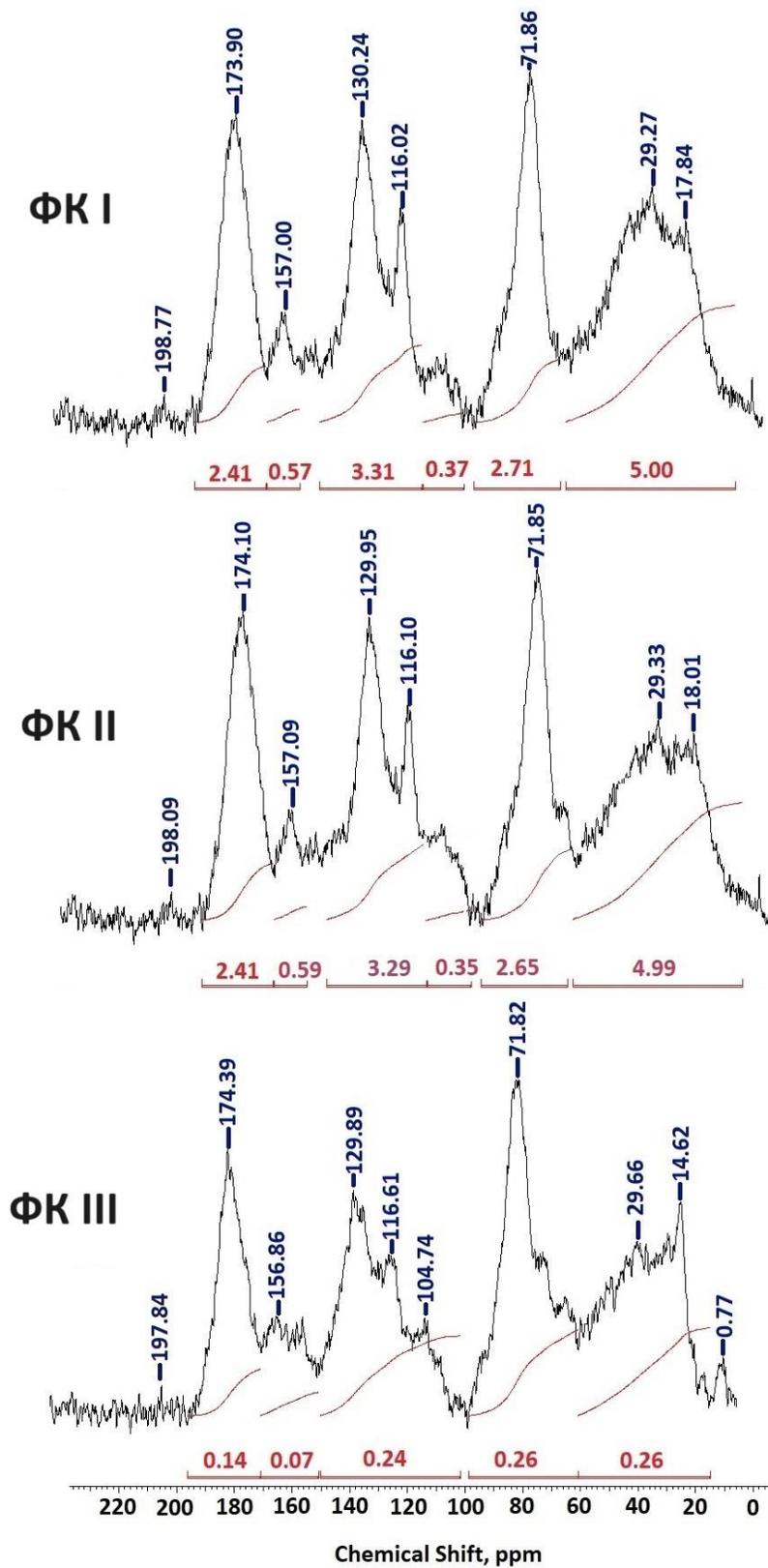


Рисунок 13. Спектры CP MAS ЯМР ^{13}C трёх форм ФК

Спектры ^{13}C ЯМР анализировали по соотношению интенсивностей сигналов спиртовых групп, карбоксильных групп, фенольных групп и пиранонового кольца. Реперная полоса представляет собой сигнал, соответствующий О-замещенным атомам углерода в спиртовых фрагментах. В таблице 9 приведены соотношения сигналов в спектрах.

Таблица 9. Соотношения интенсивностей сигналов (I) спектров ЯМР образцов ФК

Соотношение сигналов	$I_{60-80}/I_{160-180}$	$I_{60-80}/I_{120-140}$	$I_{60-80}/I_{100-120}$	I_{60-80}/I_{10-40}
ФК I	1,13	1,14	1,56	1,49
ФК II	1,10	1,12	1,58	1,50
ФК III	1,28	1,54	2,27	2,13

На основании твердотельного ^{13}C -ЯМР, ИК-Фурье, соотношения карбоксильных и фенольных групп (2:1), соотношения углерода и кислорода (1,5) мы полагаем, что полученные нами образцы ФК могут иметь фрагменты, подобные структурам, показанным на рисунке 14. Молекулярная масса (М.м.) структурного звена молекулы ФК в образце ФК I, определённая методом криоскопии, равна М.м.=740 г/моль, что является близким к литературными данным, в соответствии с которыми молекулярная масса ФК лежит в интервале 620-750 г/моль [68-74, 85, 86].

Количество азотсодержащих соединений, контролируемых по показателю содержание азота, согласно *ОФС.1.2.3.0011.15*, и в образце ФК I составило 0,17%. Это позволяет предположить, что азотсодержащие соединения присутствуют только в виде примесей.

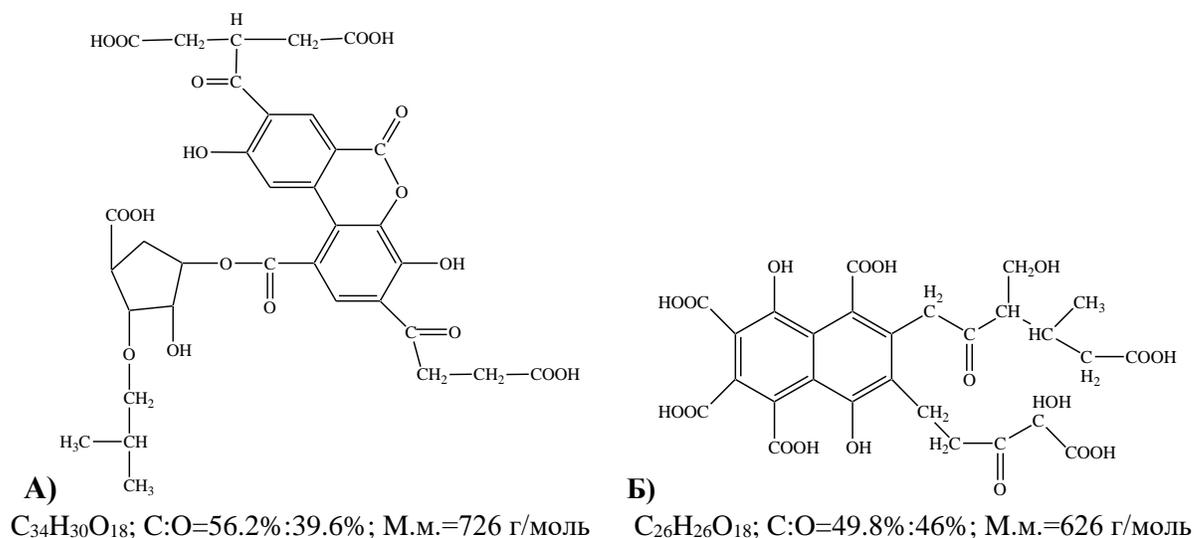


Рисунок 14. Возможные структуры полученной нами ФК

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). Образующиеся коллоидные частицы характеризуются отрицательным дзета-потенциалом (от –25 до –6 мВ), который увеличивается с уменьшением размера частиц (таблица 7).

Схема, иллюстрирующая внутри- и межмолекулярное связывание ФК со структурой рисунка 14, представлена на рисунке 15.

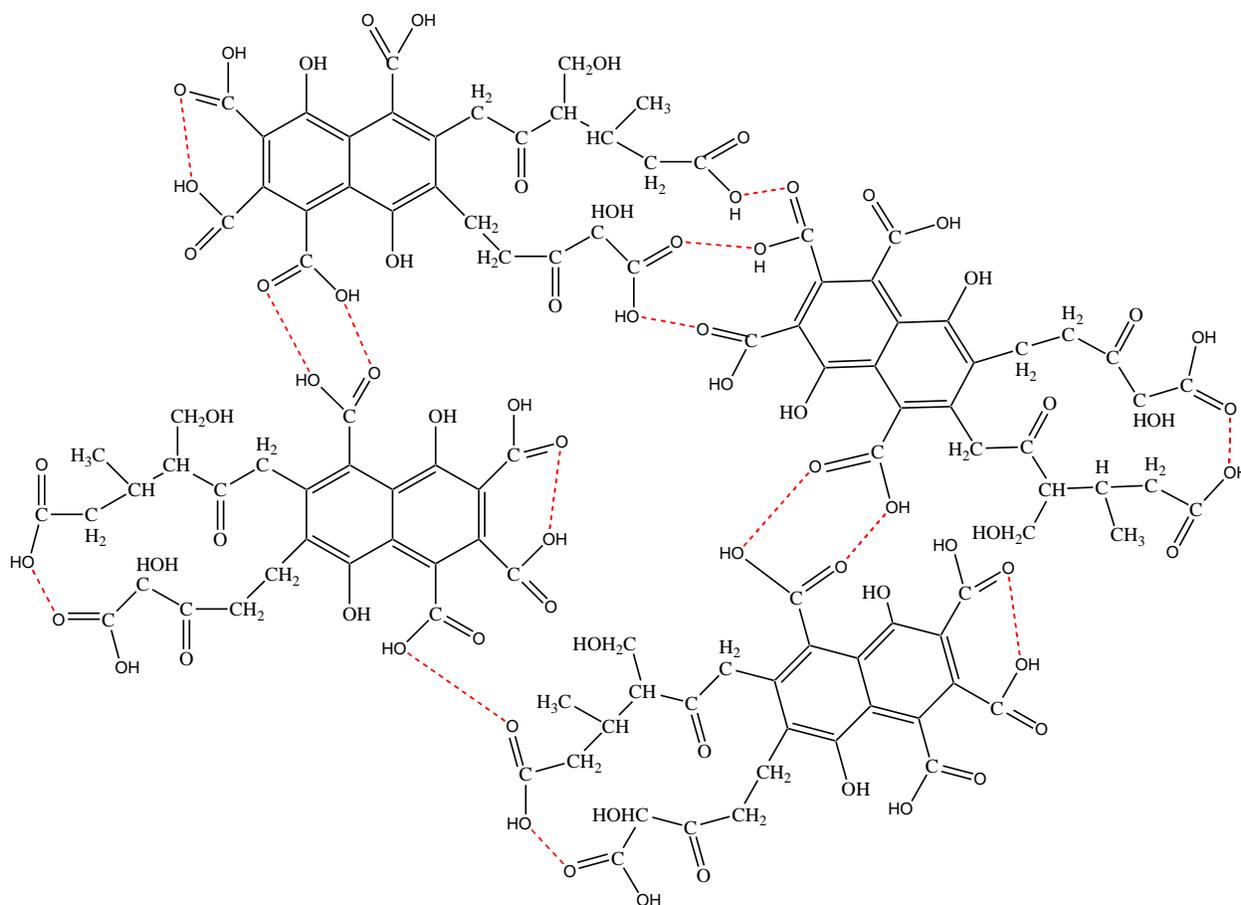


Рисунок 15. Иллюстрация возможных внутри- и межмолекулярных связей в полученной нами ФК

Флуоресцентные спектры в режимах возбуждения ($\lambda_{Em}=520$ нм) и испускания ($\lambda_{Ex}=360$ нм) для образцов ФК I, представленные на рисунке 16, совпадали с литературными данными для стандартов образцов ФК [112-118].

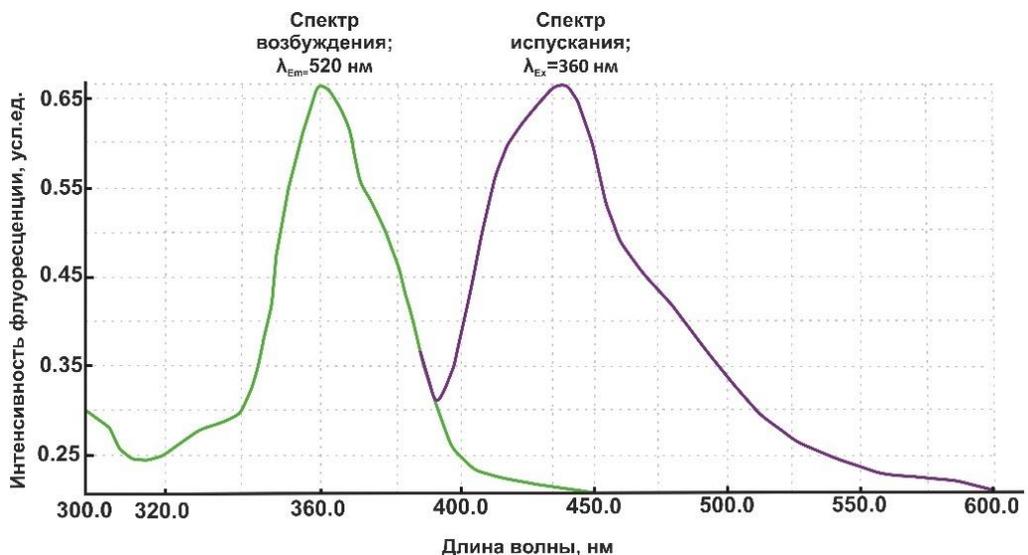


Рисунок 16. Флуоресцентные спектры водных растворов ФКІ (10 мкг/мл)

Таким образом, выбор метода сушки играет ключевую роль в сохранении качества и структурной целостности ФК. Лиофильная сушка, благодаря своим характеристикам, представляет собой предпочтительный вариант для минимизации окисления фенольных соединений и уменьшения образования структур с более высокой молекулярной массой (снижение агрегации), что важно для долгосрочной стабильности и функциональности этого соединения.

Выводы по разделу 3.1:

Таким образом, нами оптимизированы два основных метода извлечения ФК из низинного торфа Нижегородской области месторождения «Альцевский Мох»: 1) УЗ-экстракция этанолом; 2) сочетание УЗ-щелочного гидролиза с последующей селективной сорбцией ФК. Применение УЗ-обработки и использование более эффективного сорбента в процессе выделения ФК позволяют интенсифицировать процесс экстракции.

Режим сушки оказал наиболее сильное влияние на структуры ФК. Лиофильная сушка снижает образование структур с более высокой молекулярной массой по сравнению с вакуумной и конвекционной сушкой. При низкотемпературной

ступенчатой лиофилизации слипание и агрегация молекул фульвокислот минимальны. Вакуумная и конвекционная сушка вызывают более интенсивную деградацию и структурные изменения, связанные с более высокими температурами и скоростями сушки.

В зависимости от режима сушки одного и того же раствора можно получить ФК с различной растворимостью (от 3,3 мл до 12,5 мл воды на грамм), но имеющие одинаковый состав, что подтверждается данными о количестве карбоксильных и фенольных групп, элементным анализом, ИК-Фурье спектроскопией и твердотельным ^{13}C ЯМР.

Высокая концентрация кислотных групп (11-12 ммоль-экв/г), легкая растворимость образца ФК I и высокая эффективность его получения из торфа Нижегородской области России позволяют предложить ФК I в качестве внутрилабораторного стандарта. В дальнейшем в работе нами использовалась ФК I.

3.2. Разработка эмульсионных трансдермальных пластырей с фульвово кислотой

ФК является полярной гидрофильной молекулой, образующей в растворах агрегированные (ассоциированные) частицы. В связи с этим возникают проблемы при разработке составов ЛФ для наружного применения, например, мазей, гелей, трансдермальных терапевтических систем. Высвобождение малых полярных молекул и проникание через липофильный роговой слой требует введения вспомогательных веществ и создания основы, способствующей хорошему прониканию.

3.2.1. Основные компоненты эмульсионных основ

Проведённый нами сравнительный анализ различных основ для трансдермальных пластырей показал, что эмульсионные основы являются более предпочтительными по сравнению с гидрофильными и гидрофобными основами [157]. Одним из главных преимуществ эмульсионных основ является их способность обеспечивать более высокую биодоступность АФС за счёт их лучшего проникания в кожу и ткани, а также лучшей проницаемости через клеточные мембраны. Эти эффекты связаны с малым размером частиц эмульсии, которые могут иметь диаметр от 20 до 200 нм, в отличие от гидрофильных и гидрофобных основ, в которых АФС, как правило, имеют больший размер частиц. Достоинством эмульсионных основ является возможность накопления АФС в роговом слое при его высвобождении из основы, создавая своеобразное депо. Кроме того, эмульсионные основы также обладают высокой стабильностью и сохраняют свою структуру и свойства во время действия ЛП, обеспечивая его пролонгированное действие.

Таким образом, эмульсионные основы могут быть использованы в трансдермальных системах доставки АФС, обеспечивающих длительное действие, что важно в лечении хронических заболеваний.

Для получения эмульсионных основ применялись полимеры: низкомолекулярный поливинилпирролидон; высокомолекулярный кросс-сшитый сополимер акриловой кислоты и алкил (С10-30)-акрилатов (Remulen TR-1), выполняющий также роль эмульгатора и стабилизатора; ксантан – полисахарид с остатками глюкозы, маннозы, глюкуроновой кислоты и др., сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (полоксомеры). Выбор полимерных компонентов обусловлен их способностью повышать вязкость раствора, а также возможностью стабилизировать эмульсии, предотвращая их разделение. Кроме того, выбранные

полимеры позволяют обеспечить оптимальный диапазон pH, который составляет от 5,5 до 7.

Если pH продукта находится вне этого диапазона, это может привести к неэффективному использованию Remulen TR-1, поэтому в качестве регулятора pH использовался триэтаноламин (ТЭА).

Липидные компоненты представлены эмульсионным воском, канделильским воском, цетиловым спиртом, взятыми в разных соотношениях, выполняющими также роль пролонгаторов. В качестве пластификаторов, выполняющих также роль транскутантов, использовались пропиленгликоль (ПГ), глицерин, полиэтиленоксид 400 (ПЭО 400), полиэтиленоксид 1500 (ПЭО 1500), шестиатомный спирт (сорбитол), диметилсульфоксид (ДМСО).

3.2.2. Разработка оптимального состава

Нами опробованы составы, характеристика которых дана в приложении 10.

Концентрация ФК была постоянной и равнялась 0,2%. Дисперсионной средой являлась вода очищенная.

В первой серии экспериментов в качестве одного из полимеров использовался Remulen TR-1. Вне зависимости от других вспомогательных веществ, плёнка получалась неоднородной. Наиболее вероятной причиной является взаимодействие регулятора pH – ТЭА с ФК с образованием заряженных комплексных соединений, вызывающих коагуляцию эмульсии. Кроме того, было отмечено, что в изучаемых эмульсионных составах с фульвой кислотой использование липидных компонентов должно быть ограничено. Лучшие результаты были получены при использовании только одного компонента – эмульсионного воска.

Использование в качестве полимера ПВП в целом улучшает качество плёнок. В состав плёнок второй серии входили следующие вспомогательные вещества: ПЭО-400, ПЭО-1500, твин-80, глицерин, воск эмульсионный. Было отмечено, что несмотря на однородность плёнок с ПВП, они получались тонкими и хрупкими.

Для улучшения эластичности и прочности плёнок нами предложено использование комбинации ксантана и ПВП с более низкой плотностью (15000 – 20000 г/моль), в качестве липидного компонента воска эмульсионного, в качестве ПАВ и транскутантов – глицерина, ПЭО, твина 80. Повышение концентрации ксантана свыше 1,2% приводит к образованию плотных плёнок с низкой пластичностью, а при низкой концентрации ксантана, до 1,2%, плёнки плохо высыхают и остаются гелеобразными. При высоких концентрациях пластификаторов плёнки становятся гигроскопичными, а при низких – плёнки не обладают необходимой пластичностью и ломаются.

В результате исследований композиции разного состава нами предложен следующий состав:

ФК – 0,2%
Ксантан – 1,17%
Глицерин – 5,83%
ПВП К17 – 5,83%
ПЭО 400 – 0,23%
ПЭО 1500 – 2,3%
Твин 80 – 1,63%
Воск эмульсионный – 1,16%
Вода очищенная – 81,65%

Данный состав был выбран нами как базовый для исследования проникания фульвой кислоты на ячейке Франца.

Таким образом, мы провели разработку базового состава для трансдермальных пластырей с использованием фульвой кислоты в качестве действующего вещества. Для достижения нужных адгезивных свойств была использована комбинация поливинилпирролидона (ПВП К-17) и полиэтиленоксида (ПЭО 400). Эта комбинация позволила достичь необходимого уровня липкости пластырей без необходимости добавления дополнительных адгезивов.

3.2.3. Модификация базового состава

Для улучшения солюбилизации ФК в эмульсионную основу с базовым составом нами предложено введение плуроников Kolliphor марки Р, способствующих солюбилизации полярных гидрофильных молекул ФК, склонных к агрегации в водных средах.

Kolliphor марки Р является одной из наиболее популярных марок эмульгаторов и солюбилизаторов, используемых для трансдермальных пластырей в фармацевтической промышленности [158]. Kolliphor p237 обладает высокой стабильностью, применяется в качестве эмульгатора, а также может использоваться в трансдермальных пластырях с пролонгированным действием. Kolliphor p338, в свою очередь, обладает хорошей растворимостью в органических растворителях и может использоваться в качестве соэмульгатора [158].

Модифицированный состав, включающий поллоксамеры, был следующим:

ФК – 0,2%

Ксантан – 1,16%

Глицерин – 5,11%

Плуроник (Kolliphor p237 – 1,16%; Kolliphor p338 – 1,05%)

ПВП К17 – 5,8%

ПЭО 400 – 0,23%

ПЭО 1500 – 2,3%

Твин 80 – 1,62%

Воск эмульсионный – 1,16%

Вода очищенная – 81,26%; 81,37%

В качестве положительного контроля был использован ДМСО за счёт своих транскутантных свойств. ДМСО способен растворять липиды, увеличивая пористость кожи и облегчая проникновение лекарственных веществ. Также ДМСО увеличивает кровоток в области нанесения и расширяет капилляры, это повышает приток крови к коже, ускоряя проникновение АФС в организм. Модифицированный состав, включающий ДМСО представлен ниже:

ФК – 0,2%

Ксантан – 1,17%

Глицерин – 5,83%

ДМСО – 0,4%

ПВП К17 – 5,83%

ПЭО 400 – 0,23%

ПЭО 1500 – 2,3%

Твин 80 – 1,63%

Воск эмульсионный – 1,16%

Вода очищенная – 81,25%

Таким образом, нами предложены оптимальные составы плёнок, позволяющие получить трансдермальные пластыри, содержащие в качестве АФС ФК, с необходимыми адгезивными и пластичными свойствами. Для исследования высвобождения ФК из трансдермальных пластырей были исследованы 4 состава:

состав 1 (Kolliphor p237), состав 2 (Kolliphor p338), состав 3 (базовый состав+ДМСО 0,4%), состав 4 (базовый состав).

3.2.4. Исследование высвобождения фульвовой кислоты из трансдермальных пластырей

На основании исследования высвобождения ФК через ацетилцеллюлозную мембрану из трансдермальных пластырей, согласно *ОФС.1.4.2.0017.15*, были получены следующие результаты. Количество высвобожденной ФК с исходным содержанием в пластырях, равным 16 мг, составило:

- $(8,1 \pm 0,2)$ мг (состав 1, Kolliphor p237), за время 8,25 часов;
- $(4,6 \pm 0,3)$ мг (состав 2, Kolliphor p338), за время 8,5 часов;
- $(6,7 \pm 0,2)$ мг (состав 3, ДМСО), за время 5 часов;
- $(4,8 \pm 0,2)$ мг (базовый состав), за время 6,5 часов.

Указанное время относится к периоду выхода концентрации на плато.

Данные исследования высвобождения ФК через ацетилцеллюлозную мембрану из трансдермальных пластырей представлена на рисунке 17 и в таблице 10.

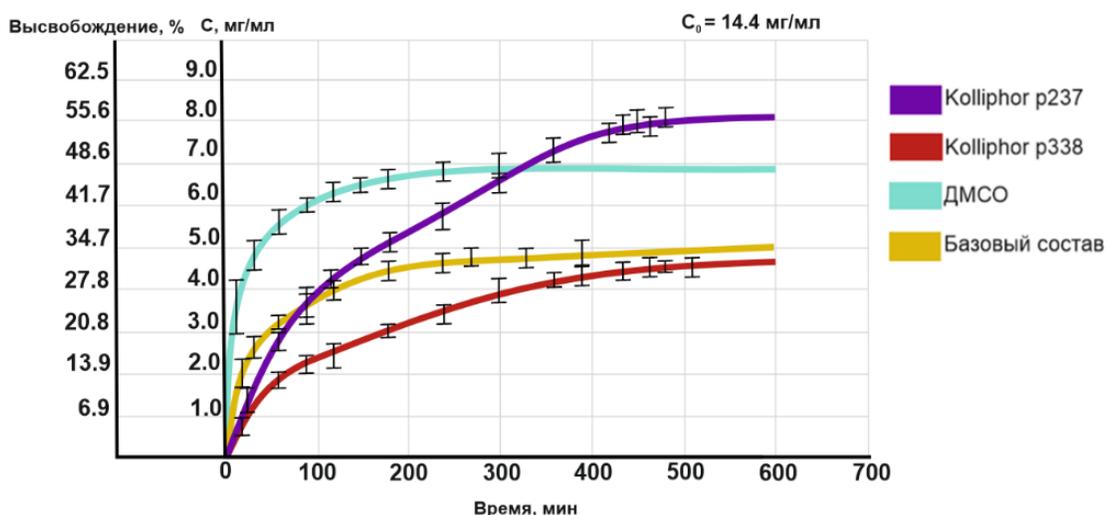
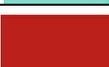


Рисунок 17. Зависимость высвобождения ФК из трансдермальных пластырей от времени для выбранных составов через целлюлозную мембрану

Показано, что пластырь с Kolliphor p338 не влияет на высвобождение ФК. Скорость высвобождения ФК из трансдермального пластыря, содержащего ДМСО, на начальном этапе (до 250 мин) максимальна, однако процент высвобождения достигал лишь 45%. Наиболее близкий к этому времени результат получен для пластыря с Kolliphor p237. При более длительном времени (500-600 мин) степень высвобождения ФК из этого пластыря достигала 56%.

Таблица 10. Результаты высвобождения ФК из трансдермальных пластырей

Цвет кривой	Пластырь	$C_{ФК}$, мг·мл ⁻¹	Высвобождение, %	Время выхода на плато, ч
	Kolliphor p237	$8,1 \pm 0,2$	56,2	8,25
	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

Из результатов эксперимента можно сделать вывод, что модифицированный состав, обозначенный как состав 1 (Kolliphor p237), показал наилучший результат по высвобождению ФК в сравнении с другими составами. Уменьшение высвобождения ФК в составе 2 (Kolliphor p338), вероятно, обусловлено его термореверсивными свойствами, приводящими к образованию гелевой матрицы при повышенной температуре и растворению при пониженной температуре. При повышении температуры гидрофобные блоки полипропиленоксида в молекуле Kolliphor p338 сближаются друг с другом, образуя жесткую гидрофобную матрицу. При пониженной температуре гидрофобные блоки отталкиваются, и гелевая структура разрушается. Такие свойства полимера приводят к уменьшению солубилизации ФК, снижающей высвобождение действующего вещества.

Высокое количество ФК, высвободившейся из состава с ДМСО связано с его хорошими свойствами как транскутанта и растворителя для ФК. Следует отметить, что использование ДМСО может вызывать раздражение и аллергические реакции, поэтому необходимо учитывать потенциальные риски и побочные эффекты.

Таким образом, исследование показало, что трансдермальный пластырь с полксамером Kolliphor p237 обеспечивает более полное и пролонгированное высвобождение ФК, чем другие составы. Это может быть особенно полезным для лечения воспалительных процессов, когда необходима продолжительная экспозиция ФК на поражённой области.

3.2.5. Исследование высвобождения фульвовой кислоты из трансдермальных пластырей с использованием диффузионной ячейки Франца

Тест на ячейке Франца позволяет оценить способность активного вещества пластыря проникать через кожу и попадать в систему кровообращения, что в свою очередь влияет на его эффективность и безопасность.

Мы изучали высвобождение ФК только из пластыря с Kolliphor p237 и сравнивали с базовым составом. Поскольку ДМСО (внутренний положительный стандарт в предыдущем эксперименте) может вызывать раздражение и аллергические реакции, его действие не исследовалось. На рисунке 18 показаны результаты исследования высвобождения ФК из трансдермальных пластырей с использованием диффузионной ячейки Франца.

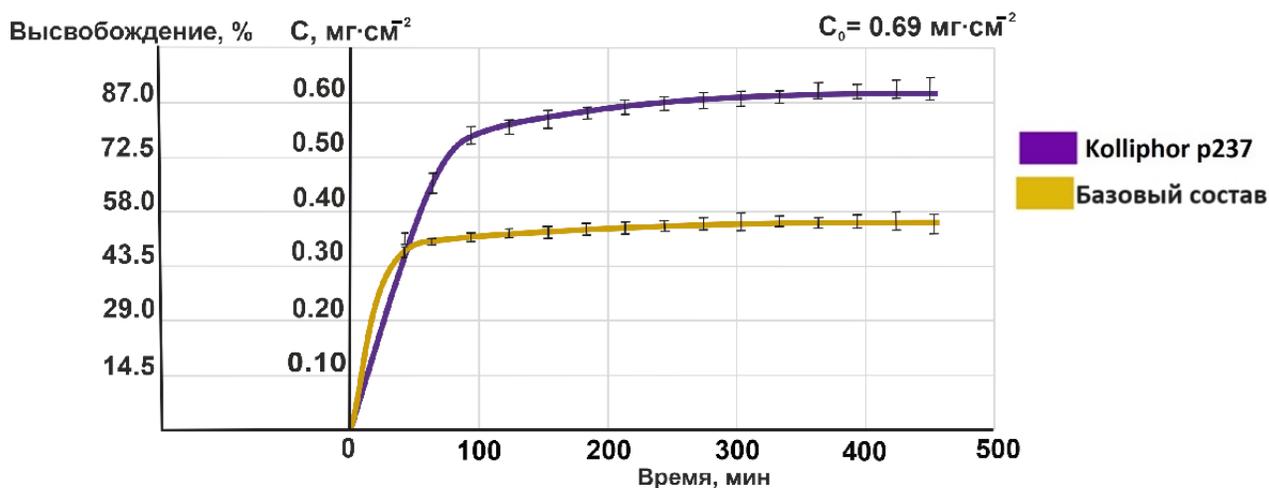


Рисунок 18. Зависимость высвобождения ФК от времени для выбранных составов через ацетилцеллюлозную мембрану на ячейке Франца

Начальная поверхностная концентрация ФК в пластырях на ацетилцеллюлозной мембране с площадью $1,3 \text{ см}^2$ составляла $0,69 \text{ мг/см}^2$. Количество высвобожденной ФК с исходным содержанием в пластырях, равным 16 мг, было равно:

- $(0.619 \pm 0,002) \text{ мг/см}^2$ (состав 1, Kolliphor p237),
- $(0.381 \pm 0,002) \text{ мг/см}^2$ (базовый состав).

Эффективность действия трансдермального пластыря с Kolliphor p237, вероятно, обусловлена более высокой солюбилизующей способностью супрамолекулярных наноразмерных частиц ФК, образующихся в растворе, по сравнению с Kolliphor p338.

Таким образом, нами разработан состав трансдермального пластыря с ФК в качестве потенциальной АФС. Данные, полученные на ячейке Франца, совпадают с данными по исследованию высвобождения, проведённой по методике *ОФС.1.4.2.0017.15*. Показано, что пластырь с полоксамером Kolliphor p237 является наиболее оптимальным с точки зрения высвобождения и проницаемости.

Выводы по разделу 3.2:

Таким образом, нами были изучены свойства вспомогательных веществ для трансдермальных пластырей, с целью подбора оптимальных составов. Были разработаны и исследованы четыре состава эмульсионных пластырей с фульвовой кислотой в качестве активной фармацевтической субстанции.

Было проведено исследование высвобождения фульвовой кислоты из разработанных составов. Сравнение высвобождения ФК из пластырей методом диализа и с использованием диффузионной ячейки Франца подтвердили высокую эффективность пластыря с плуроником Kolliphor p237.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Впервые получены три формы фульвовой кислоты, различающиеся по растворимости, дзета-потенциалу, значению рН, количеству фенольных и карбоксильных кислотных групп. ^{13}C -ЯМР спектры, Фурье-ИК-спектры, спектры флуориметрии обязательны для установления подлинности фульвовой кислоты как субстанции.
2. Разработаны и исследованы составы трансдермальных пластырей на эмульсионной основе для доставки фульвовой кислоты как потенциальной активной фармацевтической субстанции. Наиболее оптимальным по адгезивным, структурно-механическим свойствам и высвобождению является пластырь с плуроником Kolliphor p237 как солюбилизатором и транскутантом.

ГЛАВА 4. ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ

Стандартизацию потенциальной активной фармацевтической субстанции – фульвовой кислоты (ФК) проводили, используя методики установления качества по показателям «Подлинность», «Количественное определение» в соответствии с *ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик*.

4.1. Установление подлинности фульвовой кислоты

Испытания образцов ФК по показателю **подлинность** предполагают проведение комплекса физико-химических исследований, подтверждающих свойства анализируемого образца ФК при сравнении с внутрилабораторным стандартом. В ходе проведенных исследований, описанных в Разделе 3.1, показано, что 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 [COOH+Ph-OH] (не менее 12,0 ммоль-экв/г), рН 0,01% раствора (не более 3), Фурье-ИК, ¹³C-ЯМР-спектральные методы анализа, спектрофлуориметрия позволяют провести идентификацию ФК.

ИК-спектры получали для ФК в таблетках KBr, в диапазоне 500-4000 см⁻¹; Δν ±0,1 см⁻¹. ИК-спектр исследуемого образца должен совпадать со спектром внутрилабораторного стандартного образца ФК (рисунок 12, ФК I). Соответствие спектров анализируемого и стандартного образцов должно наблюдаться в области «кислотного бугра» (2700-2500 см⁻¹), в области валентных колебаний карбонильных групп C=O (1716-1717 см⁻¹), в области валентных колебаний карбоксилат иона (1650 см⁻¹), в области валентных колебаний Ph-OH (1200-1270 см⁻¹).

Специфичность Фурье-ИК спектров ФК оценивалась при сравнении со спектрами ГК – структурно близкого вещества и потенциальной примеси. 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**: $T_{\text{COOH}}/T_{\text{C=O}} (T_{1600-1650}/T_{1716-1720}) = 1,0-1,2$ (Таблица 8).

^{13}C -ЯМР-спектры ФК должны совпадать со спектрами внутрилабораторного стандартного образца ФК (рисунок 13, ФК I) и содержать сигналы, относящиеся к алифатическим (0–50 м.д.), ароматическим (108–165 м.д.) и карбоксильным (165–190 м.д.) атомам углерода, а также содержать пики в области 60–96 м.д., соответствующие О-замещенным атомам углерода (спиртовые, эфирные фрагменты). Интенсивность сигналов ^{13}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 9).

Спектры флуоресценции водного раствора ФК ($10 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) должны совпадать со спектрами внутрилабораторного стандартного образца ФК (Рисунок 16). Спектр возбуждения, снятый в диапазоне 300-500 нм при $\lambda_{\text{Em}}=520 \text{ нм}$, должен иметь полосу при 360 нм. Специфичность спектра флуориметрии ФК показана в таблице 11 по сравнению со спектром ГК – структурно близкого вещества и примеси.

Таблица 11. Специфичность флуоресцентного метода установления подлинности ФК

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

Растворимость ФК в воде должна соответствовать термину «растворим», согласно *ОФС.1.2.1.0005.15 Растворимость*, в отличие от ГК, чья растворимость соответствует термину «практически не растворим». Величина pH водных растворов ФК (0,01%) должна соответствовать $\text{pH} \leq 3$.

4.2. Количественное определение фульвовой кислоты

Количественное определение ФК проводили методом спектрофлуориметрии по спектру возбуждения (Рисунок 16).

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 12). Таким образом, методика удовлетворяла критерий специфичности.

Таблица 12. Результаты расчета относительного стандартного отклонения величин 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 13).

Таблица 13. Метрологические характеристики методики количественного определения ФК при определении показателя правильности

n	f	$X_{cp.}$	S^2	S	$S_{cp.}$	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$\Delta X_{cp.}$	$\varepsilon_{cp., \%}$	$RSD, \%$
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 13).

Линейность методики определяли для серии растворов ФК (с концентрациями в диапазоне линейности от 1 до 10 мкг/мл). Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации имеет вид $Y=aX+b$ (рисунок 19), коэффициент корреляции $R^2=0.9934$, что подтверждает линейность методики.

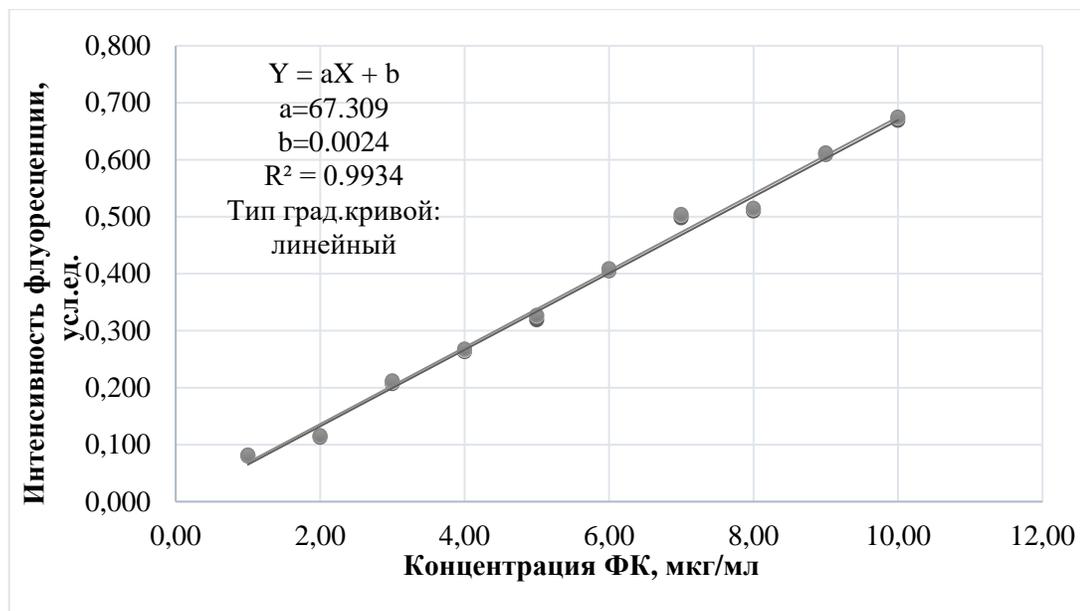


Рисунок 19. Вид калибровочной прямой и уравнение прямой для исследования линейности метода

Для определения **прецизионности** (повторяемости и воспроизводимости) мы проводили испытания многократно при соблюдении следующих условий. **При определении повторяемости** мы проводили измерения количества ФК в течении малого 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 14).

Таблица 14. 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		

Продолжение таблицы 14

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		

4.3. Методики определения примесей фульвово́й кислоты

Основной примесью в субстанции ФК являются азотсодержащие соединения, которые мы контролировали по показателю «содержание азота» ($<0,17\%$) методом Кьельдаля, согласно *ОФС.1.2.3.0011.15* Суммарное содержание азота должно быть не более $0,17\%$.

Содержание тяжёлых металлов контролировалось, согласно *ОФС.1.5.3.0009.15*:
1) атомно-абсорбционной спектроскопией с использованием ламп полого катода и стандартных образцов; 2) атомно-эмиссионной спектроскопией с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП).

Испытания на тяжёлые металлы при заготовке торфа проводились по ГОСТ Р 53218-2008. Протоколы испытаний торфа от фирмы-производителя и фирмы-поставщика представлены в приложении 2.

Нами в исходных образцах торфов были обнаружены следующие металлы (ppm): Ca (5-10 ppm), Fe (10-15 ppm), Si (10-20 ppm), Mg (5-10 ppm). В полученной ФК эти элементы практически не обнаруживаются методами ААС и АЭС-ИСП (таблица 15). Достоверно отсутствовали ионы тяжёлых металлов: Pb, As, Hg, Cd.

Таблица 15. Микроэлементный состав примесей в продуктах, выделенных из торфа

№	Продукты	Микроэлементный состав		Применённые процедуры
		Металлы (в ppm)	Азот, сера, фосфор (в %)	
1	Na-ГК + Na-ФК	Ca – 2, Fe – 10, Si – 10, Mg – 3	[N] – 0,17±0,02	Торф измельчённый и просеянный обработан 0,1 М NaOH и ультразвуком при нагревании (80°C)
2	ФК	Ca – 2, Fe – 10, Si – 10, Mg – 3	[N] – 0,11±0,02	Продукт 1, обработанный H ₂ SO ₄ конц. Очистка по методу Ламара

По результатам исследований разработан проект спецификации «Фульвовая кислота низинного торфа Нижегородской области Тоншаевского района, месторождения «Альцевский Мох» (Приложение 11).

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУЛЬВОВОЙ КИСЛОТЫ

ФК обладает широким спектром биологической активности, что было рассмотрено в главе 1. Как следует из анализа литературных данных, биологическая активность фульвовой кислоты, даже выделенной из одного и того же источника, сильно зависит от структурной модификации, что обусловлено способом её извлечения, очистки и сушки. Более того, биологическая активность фульвовой кислоты, выделенной из различных сырьевых источников, существенно различается. В связи с этим, необходимо было подтвердить биологическую активность полученной нами ФК в эксперименте на животных.

Наиболее изученными является противовоспалительное и антиоксидантное действие ФК. В эксперименте на крысах показано уменьшение отека лап у крыс при воспалении, вызванном каррагинаном [1]. ФК снижает уровень С-реактивного белка у больных остеоартрозом коленного сустава, сопровождающимся прогрессирующей деструкцией хряща [40]. Как и все гуминовые вещества, ФК оказывают дозозависимое действие на иммунную систему, как индуцируя, так и уменьшая воспалительные процессы.

Ревматоидный артрит (РА) – это заболевание, которое может быть связано с гиперактивностью иммунных клеток, вызывающих воспаление. РА протекает на фоне усиления процесса окислительного стресса. В ходе патогенеза активируется генерация АФК. Продукты АФК оказывают деструктивное действие на биологические системы, инициируют ПОЛ, а также приводят к морфологическим и функциональным нарушениям клеточных структур, деградациии коллагена, повреждению соединительной ткани [159]. Повреждающему процессу ПОЛ противодействует антиоксидантная система. В связи с этим очень важно изучение ФК,

обладающей антиоксидантной активностью, как потенциального защитника от окислительного стресса.

5.1. Исследование антиоксидантной активности фульвовой кислоты на модели адьювант-индуцированного артрита на крысах

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 контролю (интактные крысы). Исследовалось влияние ФК на активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД), лактатдегидрогеназы в прямых и обратных реакциях (ЛДГ прям., ЛДГ обр.).

На 15-е сутки после возникшего воспаления в отсутствие лечения увеличилась удельная активность всех ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, ГР, Г6ФД, ЛДГ прям., ЛДГ обр), что характеризует их активацию как ответ на развивающийся окислительный стресс на фоне РА (Таблица 16). Эти результаты согласуются с исследованиями авторов, продемонстрировавшими значительное повышение активности ферментов в различных тканях (печени, сердце, мышцах, сыворотке крови) от 1,2 до 1,7 раза [160-162].

Таблица 16. Уровень антиоксидантной активности у крыс (n=3)

Группы	Уровень ферментов					
	СОД, инг/мин·мг белка (%)	Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мин ·мг белка (%)	ГР, НАДФН /мин·мг белка (%)	Г6ФД, НАДФН /мин·мг белка (%)	ЛДГ прям., НАДФН /мин·мг белка (%)	ЛДГ обр., НАДФН/ мин·мг белка (%)
Интактные	1013,0±61,2 (100%)	34,7±1,7 (100%)	87,4±3,1 (100%)	43,2±2,9 (100%)	42,2±2,4 (100%)	183,7±7,5 (100%)
Контроль (без лечения), τ=15 дней	1502,0±39,2 (148%)	58,9±2,0 (170%)	131,1±3, 8 (150%)	64,2±2,9 (149%)	73,3±5,3 (174%)	274,8±8,9 (150%)
Контроль (без лечения), τ=21 дней	805,0±37,4 (79%)	33,2 ±0,6 (96%)	120,9±5, 9 (138%)	60,1±1,8 (139%)	65,5±4,1 (155%)	251,6±7,8 (137%)
Базовый состав (7- дневное лечение)	997,4±20,8 (98%)	42,0±1,8 (121%)	102,5±3, 6 (117%)	62,6±3,0 (118%)	53,2±4,2 (126%)	226,0±13, 7 (123%)
Kolliphor p237 (7- дневное лечение)	1174,2±43,1 (116%)	44,5±1,5 (128%)	94,2±3,2 (108%)	56,0±3,5 (123%)	51,0±3,0 (121%)	218,8±5,4 (119%)

О развитии окислительного стресса на фоне РА на 15-е сутки моделирования процесса РА свидетельствует также повышение удельной активности АлДГ и уровня МДА как в плазме, так и в эритроцитах (Таблица 17). После 7-дневного лечения (с 15 по 21 день эксперимента) трансдермальными пластырями с базовым составом и с Kolliphor p237 уровень удельной активности всех ферментов вернулся к норме и был близок к таковому в группе интактных животных (положительный контроль, таблица 16). После лечения трансдермальными пластырями наблюдалось незначительное повышение уровня удельной активности СОД, каталазы, ГР и Г6ФД, что, вероятно, связано с антиоксидантными свойствами ФК.

Таблица 17. Биохимические показатели ПОЛ у крыс (n=3)

Группы	Уровень ферментов		
	АлДГ, нмоль НАДФН/мин·мг белка (%)	МДА (в плазме), нмоль НАДФН/мин·мг белка (%)	МДА (в эритроцитах), нмоль НАДФН/мин· мг белка (%)
Интактные	41,9±3,1 (100%)	0,9±0,0 (100%)	7,3±0,3 (100%)
Контроль (без лечения), τ=15 дней	65,7±5,2 (157%)	2,5±0,1 (278%)	12,3±0,2 (168%)
Контроль (без лечения), τ=21 дней	61,6±4,8 (147%)	2,2±0,1 (242%)	11,9±0,2 (164%)
Базовый состав (7- дневное лечение)	54,7±3,4 (131%)	1,8±0,0 (204%)	8,7±0,3 (119%)
Kolliphor p237 (7- дневное лечение)	51,6±1,4 (123%)	1,7±0,1 (191%)	7,9±0,2 (108%)

Активность АлДГ при лечении как базовым составом, так и составом Kolliphor p237 снижалась по сравнению с контролем без лечения в сторону нормализации данного показателя. Уровень МДА в эритроцитах под действием ФК в трансдермальном пластыре также снижался. Следует отметить, что МДА в эритроцитах снижается практически до состояния интактных животных (Таблица 17).

Таким образом, в эксперименте *in vivo* на крысах установлено ингибирование процессов перекисного окисления липидов, увеличение активности супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, под действием фульвово́й кислоты.

5.2. Исследование противовоспалительной активности фульвовой кислоты на модели адьювант-индуцированного артрита на крысах

Через несколько часов после инъекции конечности, в которые вводили полный адьювант Фрейнда, опухли и значительно увеличились. Через неделю после инъекции диаметр коленного сустава значительно увеличился на 120-130%. Выраженное увеличение диаметра сустава подтвердило успешное развитие воспаления. Развитие артрита прекратилось на 15-е сутки после введения в коленный сустав полного адьюванта Фрейнда, после чего было начато лечение с использованием пластыря в течение 7 дней.

Результаты гистопатологического исследования адьювант индуцированного артрита у крыс линии Wistar представлены на рисунке 20 и в таблице 18.

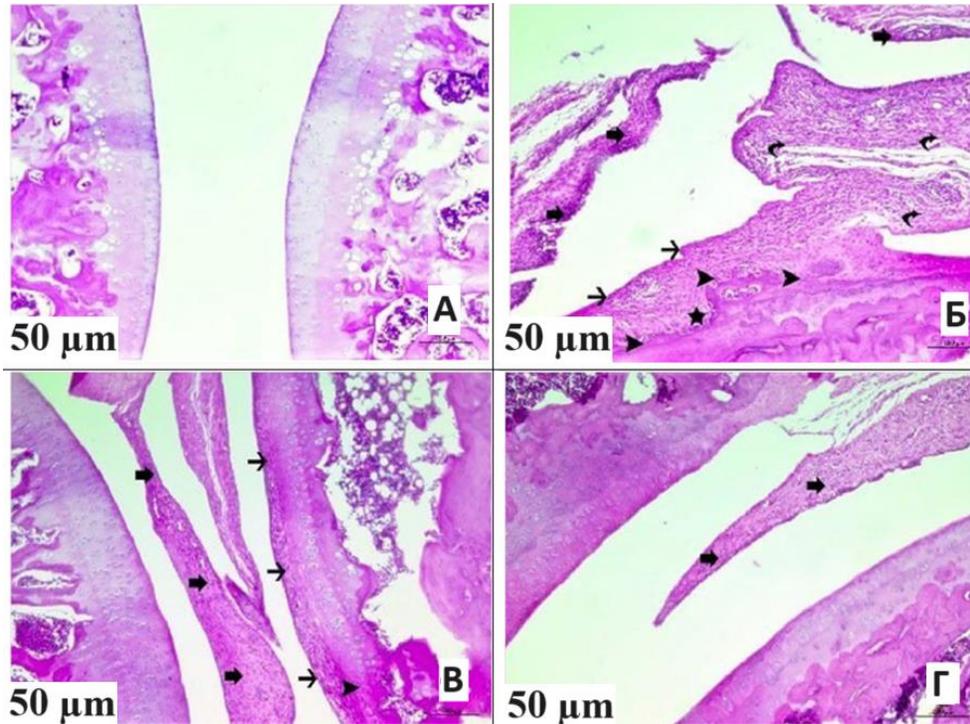


Рисунок 20. Гистопатологические результаты (H&E, ×100-кратное увеличение, масштабная линейка 50 мкм). (А) Интактная группа, (Б) Контрольная группа (без лечения), (В) Экспериментальная группа (Базовый состав), (Г) Экспериментальная группа (Kolliphor p237). Черная тонкая стрелка, наконечник стрелки и звездочки указывают на фибрилляцию, эрозию и изъязвление хряща соответственно. Толстая стрелка указывает на синовиальную инфильтрацию мононуклеарными клетками. Изогнутая стрелка указывает на образование Паннуса

В интактной группе наблюдалось нормальное гистологическое строение капсулы сустава, синовиальной оболочки, хряща и костной ткани. В отличие от этого, в контрольной группе (без лечения) наблюдались дегенерация хондроцитов, эрозии/изъязвления хряща, фибрилляция хряща и инфильтрация синовиальной оболочки мононуклеарными клетками. В опытных группах (базовый состав, Kolliphor p237) дегенеративные процессы уменьшились (Таблица 18). В группе, получавшей пластырь с Kolliphor p237, наблюдалась минимальная дегенерация хондроцитов и

эрозия хряща, а также умеренная фибрилляция хряща и инфильтрация синовиальной мембраны мононуклеарными клетками.

Таблица 18. Гистопатологическая оценка адьювант-индуцированного артрита

Группы	Дегенерация хондроцитов	Эрозия/изъязвление хряща	Фибрилляция хряща	Инфильтрация
Группа 1 (интактная)	–	–	–	–
Группа 2 (контрольная)	++++	++++	++++	++++
Группа 3 (опыт с базовым составом)	++	++	++	+++
Группа 4 (опыт с Kolliphor p237)	+	+	++	++

Примечание: Степень выраженности: – Нет; + Минимальная; ++ Легкая; +++ Умеренная; +++++ Тяжелая

Этот результат может указывать на то, что трансдермальный пластырь с Kolliphor p237 оказал противовоспалительное действие.

Более объективными показателями снижения воспалительного процесса при лечении трансдермальными пластырями являются показатели маркеров воспаления (скорость оседания эритроцитов – СОЭ, количество лейкоцитов, концентрация С-реактивного белка, концентрация ревматоидного фактора – РФ). На 15-е сутки по мере развития воспалительного процесса резко повышался уровень маркеров воспаления (таблица 19). В процессе лечения с 15 по 21 день трансдермальными пластырями с ФК снизились следующие показатели: СОЭ с 10,5 до 4,9-3,8 мм/ч, количество лейкоцитов с 19,4 до 11,6-10,4 ($\cdot 10^9$ /л), концентрация С-реактивного белка от 12,6 до 5,0-4,5 нг/мл, концентрация РФ от 8,2 до 6,3-5,0 МЕ/мл. На 21-е сутки без лечения эти показатели были неудовлетворительными (Таблица 19).

Таблица 19. Уровень маркеров воспаления у крыс (n=3)

Группы	Биохимические показатели			
	СОЭ, мм/ч	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	С- реактивный белок, нг/мл	РФ, МЕ/мл
Интактные	3,5 ±0,2 (100%)	9,9±0,5 (100%)	4,0±0,4 (100%)	5,4±0,3 (100%)
Контроль (без лечения), τ=15 дней	10,5±0,5 (300%)	19,4±1,0 (196%)	12,6±0,6 (315%)	8,2±0,2 (152%)
Контроль (без лечения), τ=21 дней	8,6±0,3 (246%)	16,6±1,4 (168%)	10,7±0,8 (267%)	7,8±0,4 (144%)
Базовый состав (7-дневное лечение)	4,9±0,2 (140%)	11,6±0,6 (117%)	5,0±0,7 (125%)	6,3±0,2 (117%)
Kolliphor p237 (7-дневное лечение)	3,8±0,4 (109%)	10,4±0,7 (105%)	4,5±0,6 (112%)	5,0±0,3 (93%)

В целом следует отметить, что все анализируемые показатели – маркеры воспаления, на фоне лечения в течение 21 дня практически вернулись к норме.

Таким образом, в эксперименте *in vivo* на крысах установлено противовоспалительное действие фульвовой кислоты по снижению маркеров воспаления: скорости оседания эритроцитов (СОЭ), количества лейкоцитов, концентрации С-реактивного белка и ревматоидного фактора (РФ).

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

Впервые предложен состав трансдермального пластыря с фульвовой кислотой для лечения хронических воспалительных заболеваний на примере ревматоидного артрита.

Эффективность пластыря была продемонстрирована в экспериментах *in vivo* на крысах на модели артрита с использованием полного адьюванта Фрейнда. Влияние фульвовой кислоты на фоне патологии проявлялось в изменении биохимических показателей в сторону положительного контроля (интактные крысы).

Фульвовая кислота в составе трансдермального пластыря влияет на ферментную систему антиоксидантной защиты, нормализуя такие биохимические показатели, как СОД, каталаза, ГР, Г6ФД, каталитическую активность ЛДР в прямых и обратных реакциях, а также нормализует содержание маркеров воспаления – СОЭ, концентрацию С-реактивного белка и РФ, количество лейкоцитов в эксперименте на крысах с воспалением.

Таким образом, в эксперименте на крысах установлено антиоксидантное и противовоспалительное действие фульвовой кислоты. Можно предположить, что использование трансдермальных пластырей с фульвовой кислотой может быть эффективным при лечении воспалительных заболеваний, вызванных окислительным стрессом.

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»). УЗ-щелочная 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-, ^{13}C -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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khuda, F. Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities of natural organic matter extracted from cretaceous shales in district Nowshera-Pakistan / F. Khuda, M. Anjum, S. Khan, H. Khan, M.U.K. Sahibzada, A. Khusro, A. Jan, N. Ullah, Y. Shah, Zakiullah, M. Abbas, T. Iftikhar, A.M. Idris, M.U. Khandaker, T.B. Emran // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2022. – V. 15. – P. 103633. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103633.
2. Csicsor, A.; Tombácz, E. Screening of Humic Substances Extracted from Leonardite for Free Radical Scavenging Activity Using DPPH Method / A. Csicsor, E. Tombácz // *Molecules*. – 2022. – V. 27. DOI: 10.3390/molecules27196334.
3. Vašková, J. Therapeutic Efficiency of Humic Acids in Intoxications / J. Vašková, M. Stupák, M. Vidová Uğurbaşı, D. Žatko, L. Vaško // *Life*. – 2023. – V.13. DOI:10.3390/life1304097.
4. Zolghadr, L. A New Insight Into the Anti Proliferative and Apoptotic Effects of Fulvic and Humic Acids as Bio Product of Humus on Breast Cancer Cells, Optimized by Response Surface Methodology / L. Zolghadr, G.R. Behbehani, B. Pakbin, S.A. Hosseini, N. Gheibi // *Waste Biomass Valor*. – 2023. – V. 14. – P. DOI: 10.1007/s12649-022-01863-1.
5. Pant, K. Anti-Proliferative and Anticancer Properties of Fulvic Acid on Hepatic Cancer Cells / K. Pant, A. Gupta, P. Gupta, A. Ashraf, A. Yadav, S. Venugopal // *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. – 2015. – V. 5. – P. S2. DOI: 10.1016/j.jceh.2015.07.005.
6. Zhernov, Y.V. Antiviral activity of natural humic substances and shilajit materials against HIV-1: Relation to structure / Y.V. Zhernov, A.I. Konstantinov, A. Zherebker, E. Nikolaev, A. Orlov, M.I. Savinykh, G.V. Kornilaeva, E.V. Karamov, I.V.

- Perminova // *Environmental Research*. – 2021. – V. 193. – P. 110312. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110312.
7. Socol, D.C. Clinical review of humic acid as an antiviral: Leadup to translational applications in clinical humeomics / D.C. Socol // *Frontiers in Pharmacology*. – 2023. – V. 13. – P. 1-11. DOI: 10.3389/fphar.2022.1018904.
8. Hafez, M. Humic substances as an environmental- friendly organic wastes potentially help as natural anti-virus to inhibit COVID-19 / M. Hafez, A.I. Popov, V.N. Zelenkov, T.V. Teplyakova, M. Rashad // *Science Archives*. – 2020. – V. 1. – N 2. – P. 53-60. DOI: 10.47587/SA.2020.1202.
9. van Rensburg, C.E. The Antiinflammatory Properties of Humic Substances: A Mini Review / C.E. van Rensburg // *Phytotherapy Research*. – 2015. – V. 29. – N 6. DOI: 10.1002/ptr.5319.
10. Winkler, J. Therapeutic Potential of Fulvic Acid in Chronic Inflammatory Diseases and Diabetes / J. Winkler and S. Ghosh // *Journal of Diabetes Research*. – 2018. – V. 2018. DOI: 10.1155/2018/5391014.
11. Shikalgar, T.S. Evaluation of cardioprotective activity of fulvic acid against isoproterenol induced oxidative damage in rat myocardium / T.S. Shikalgar, N.S. Naikwade // *International Research Journal Of Pharmacy*. – 2018. – V. 9. – N 1. – P. 71-80. DOI: 10.7897/2230-8407.09111.
12. Uspenskaya, E.V. A Comprehensive Biological and Physico-Chemical Characterization of Humic and Fulvic Acids Nanoparticles as a Perspective Drug / E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva, T.V. Grebennikova, I.V. Kazimova, I.T. Fedyakina, V.V. Lebedeva, O.E. Latyshev, O.V. Eliseeva, V.F. Larichev, T.M. Garaev, T.V. Maximova, M.A. Morozova, P.M. Hang, A.V. Syroeshkin // *Preprints* – 2021. – V. 2021060245. DOI: 10.20944/preprints202106.0245.v1.

13. Schepetkin, I. Complement-fixing Activity of Fulvic Acid from Shilajit and Other Natural Sources / I. Schepetkin, Gang Xie, M. Jutila, M. Quinn // *Phytother Res.* – 2009. – V. 23. – N 3. – P. 373-384. DOI: 10.1002/ptr.2635.
14. Gao, Y. Effects of fulvic acid on growth performance and intestinal health of juvenile loach *Paramisgurnus dabryanus* (Sauvage) / Y. Gao, J. He, Z. He, Z. Li, B. Zhao, Y. Mu, J.-Y. Lee, Z. Chu // *Fish & Shellfish Immunology.* – 2017. – V. 62. – P. 47-56. DOI. 10.1016/j.fsi.2017.01.008.
15. Khan, R. In Vitro and In Vivo Investigation of a Dual-Targeted Nanoemulsion Gel for the Amelioration of Psoriasis / R. Khan, M.A. Mirza, M. Aqil, T.S. Alex, N. Raj, N. Manzoor, P.P. Naseef, S.M. Kuruniyan, Z. Iqbal // *Gels.* – 2023. – V. 9. DOI: doi.org/10.3390/gels9020112.
16. Khan, R. A Pharmaco-Technical Investigation of Thymoquinone and Peat-Sourced Fulvic Acid Nanoemulgel: A Combination Therapy / R. Khan, M.A. Mirza, M. Aqil, N. Hassan, F. Zakir, M.J. Ansari, Z.A. Iqbal // *Gels.* – 2022. – V. 8. DOI: doi.org/10.3390/gels8110733.
17. Solovyeva, A. The Dermatological Hydrogel Containing Fulvic Acids / A. Solovyeva, P. Peretyagin, O. Vorobyova, N. Didenko, V. Korobko, I. Jdanovich, N. Melnikova // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* – 2017. – V. 47. – P. 52-57.
18. Gandy, J.J. Randomized, parallel-group, double-blind, controlled study to evaluate the efficacy and safety of carbohydrate-derived fulvic acid in topical treatment of eczema / J.J. Gandy, J.R. Snyman, C.E. van Rensburg // *Clinical, cosmetic and investigational dermatology.* – 2011. – V. 11. – P. 145-148. DOI: 10.2147/CCID.S23110.
19. Lamar, R.T. A New Standardized Method for Quantification of Humic and Fulvic Acids in Humic Ores and Commercial Products / R.T. Lamar, D.C. Olk, L. Mayhew, P.R. Bloom // *Journal of AOAC INTERNATIONAL.* – 2014. – V. 97. – P.721-730. DOI: 10.5740/jaoacint.13-393.

20. Kulikova, N.A. Modified Humic Substances as Soil Conditioners: Laboratory and Field Trials / N.A. Kulikova, A.B. Volikov, O.I. Filippova, V.A. Kholodov, N.V. Yaroslavtseva, Y.R. Farkhodov, A.V. Roznyatovsky, Y.K. Grishin, O.T. Zhilkibayev, I.V. Perminova // *Agronomy*. – 2021. – V. 11. DOI: 10.3390/agronomy11010150.
21. Perminova, I.V. Humic substances and living systems: Impact on environmental and human health / I.V. Perminova, Jose-Maria Garcia-Mina, D.C. Podgorski, F.J. Cervantes, E.N. Efremenko, J.L. Domingo // *Environmental Research*. – 2021. – V. 194. DOI: 10.1016/j.envres.2021.110726.
22. Khreptugova, A.N. Comparative Studies on Sorption Recovery and Molecular Selectivity of Bondesil PPL versus Bond Elut PPL Sorbents with Regard to Fulvic Acids. / A.N. Khreptugova, T.A. Mikhnevich, A.A. Molodykh, S.V. Melnikova, A.I. Konstantinov, G.D. Rukhovich, A.B. Volikov, I.V. Perminova // *Water*. – 2021. – V. 13. DOI: 10.3390/w13243553.
23. Zhilkibayev, O.T. The Coal Humic Product EldORost Shows Fertilizing and Growth Stimulating Properties on Diverse Agricultural Crops / O.T. Zhilkibayev, T.E. Aitbayev, A.M. Zhirkova, I.V. Perminova, A.I. Popov, S.A. Shoinbekova, M.S. Kudaibergenov, K.M. Shalmaganbetov // *Agronomy*. – 2022. – V. 12. DOI: 10.3390/agronomy12123012.
24. Volikov, A. NOMspectra: An Open-Source Python Package for Processing High Resolution Mass Spectrometry Data on Natural Organic Matter / A.Volikov, G. Rukhovich, I.V. Perminova // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2023. – V. 34. – N 7. – P. 1524-1527. DOI: 10.1021/jasms.3c00003.
25. Белоусов, М.В. Исследование химических и токсических свойств гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа Томской области / М.В. Белоусов, Р.Р. Ахмеджанов, М.В. Гостищева, М.С. Юсубов, А.В. Матвеевко // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2009. – Т. 8. – N 4-2. – С. 27-32. DOI: 10.20538/1682-0363-2009-4(2)-27-32.

26. Белоусов, М.В. Исследование гепатозащитных свойств нативных гуминовых кислот низинного торфа Томской области / М.В. Белоусов, Р.Р. Ахмеджанов, М.В. Зыкова, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48. – N 4. – С. 28-31. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-4-28-31.
27. Белоусов, М.В. Влияние нативных гуминовых кислот низинного торфа томской области на окислительное фосфорилирование в митохондриях в условиях гипоксии / М.В. Белоусов, Р.Р. Ахмеджанов, М.В. Зыкова, К.Ю. Васильев, М.С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – N 4. – С. 39-43. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-4-39-43.
28. Зыкова, М.В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения / М.В. Зыкова, Л.А. Логвинова, М.В. Белоусов // Традиционная медицина – 2018. – Т. 53. – N 2. – С. 27-38.
29. Zykova, M.V. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins / M.V. Zykova, I.A. Schepetkin, M.V. Belousov, S.V. Krivoshechekov, L.A. Logvinova, K.A. Bratishko, M.S. Yusubov // Molecules. – 2018. – V.23. DOI: 10.3390/molecules23040753.
30. Zykova, M.V. Quantitative Structure-Activity Relationship, Ontology-Based Model of the Antioxidant and Cell Protective Activity of Peat Humic Acid / M.V. Zykova, K.S. Brazovskii, K.A. Bratishko, E.E. Buyko, L.A. Logvinova, S.V. Romanenko, A.I. Konstantinov, S.V. Krivoshechekov, I.V. Perminova, M.V. Belousov // Polymers. – 2022. – V. 14. DOI: 10.3390/polym14163293
31. Зыкова, М.В. Стандартизация гуминовых кислот низинного древесно-травяного вида торфа Томской области / М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, А.М. Гурьев, Р.Р. Ахмеджанов, М.С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 47. – N 12. – С. 53-56. DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-12-53-56.

32. Зыкова, М.В. Химико-фармакологическое исследование субстанции гуминовых веществ угля для целей применения в пищевой и фармацевтической промышленности / М.В. Зыкова, К.А. Братишко, Л.А. Логвинова, В.В. Иванов, Е.Е. Буйко, М.Г. Данилец, Е.С. Трофимова, А.А. Лигачева, А.П. Зима, Е.С. Рабцевич, А.А. Уфандеев, Д.А. Михалёв, А.В. Першина, А.И. Константинов, И.В. Перминова, В.М. Белоусов // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2023. – Т. 31. – N 4. – С. 379-389. DOI: 10.15372/KhUR2023480.
33. Uspenskaya, E.V. Nanodispersions of Polyelectrolytes Based on Humic Substances: Isolation, Physico-Chemical Characterization and Evaluation of Biological Activity / E.V. Uspenskaya, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, I.V. Kazimova, T.V. Grebennikova, I.T. Fedyakina, V.V. Lebedeva, O.E. Latyshev, O.V. Eliseeva, V.F. Larichev, T.M. Garaev, T.V. Maximova, M.A. Morozova, P.M. Hanh // *Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111954.
34. Казымова, И.В. Эффект снижения токсичности фторхинолонов в средах растворения разной природы / И.В. Казымова, А.Л. Татарина, Е.В. Успенская // *Медико-фармацевтический журнал "Пульс"*. – 2022. – Т. 24. – N 6. – С. 132-136. DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-6-132-136.
35. Kuznetsova, I. Structure and physical–chemical properties of humic acids of oligotrophic peat bog of Arkhangelsk Region / I. Kuznetsova, K. Bogolitsyn, N. Larionov, T. Boytsova, I. Palamarchuk, A. Aksenov // *Ekologia (Bratislava)*. – 2014. – V. 33. – N 1. – P. 1-8. DOI: 10.2478/eko-2014-0001
36. Rodríguez, N.C. Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound // N.C. Rodríguez, E.C. Urrutia, B.H. Gertrudis, J.P. Chaverri, G.B. Mejía // *Journal of Food, Agriculture & Environment*. – 2011. – V. 9. – P. 123-127.
37. Aeschbacher, M. Antioxidant Properties of Humic Substances / M. Aeschbacher, C. Graf, R.P. Schwarzenbach, M. Sander // *Environmental Science & Technology*. – 2012. – V. 21. – P. 4916-4925. DOI: 10.1021/es300039h.

38. Sabi, R. Carbohydrate-derived Fulvic acid (CHD-FA) inhibits Carrageenan-induced inflammation and enhances wound healing: efficacy and Toxicity study in rats / R. Sabi, P. Vrey, C.E.J. van Rensburg // *Drug Development Research*. – 2012. – V. 73. – N 1. – P. 18-23. DOI: 10.1002/ddr.20445.
39. Schepetkin, I. Medical Drugs From Humus Matter: Focus on Mumie / I. Schepetkin, A. Khlebnikov, B. Se Kwon // *Drug Development Research*. – 2002. – V. 57. – P. 140-159. DOI: 10.1002/ddr.10058.
40. Gängen, G. The effect of mud pack therapy on serum YKL-40 and hsCRP levels in patients with knee osteoarthritis / G. Gängen, A. Fusan, G. Findikoğlu, R. Simin // *Rheumatol Int*. – 2012. – V. 32. – P. 1235-1244. DOI: 10.1007/s00296-010-1727-4.
41. Verrillo, M. Antiflammatory activity and potential dermatological applications of characterized humic acids from a lignite and a green compost / M. Verrillo, M. Parisi, D. Savy, G. Caiazzo, R.D. Caprio, M.A. Luciano, S. Cacciapuoti, G. Fabbrocini, A. Piccolo // *Scientific Reports*. – 2022. – V. 12. – P. 1-13. DOI: 10.1038/s41598-022-06251-2.
42. Junek, R. Bimodal effect of humic acids on the LPS-induced TNF- α release from differentiated U937 cells /R. Junek, R. Morrow, J.I. Schoenherr, R. Schubert, R. Kallmeyer, S. Phull, R. Klöcking // *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. – 2009. – V. 16. – N 5. – P. 470-476. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.10.003.
43. Chien, S.J. Fulvic acid attenuates homocysteine-induced cyclooxygenase-2 expression in human monocytes / S.J. Chien, T.C. Chen, H.C. Kuo, C.N. Chen, S.F. Chang // *BMC Complement Altern Med*. – 2015. – V. 15. – № 61. DOI: 10.1186/s12906-015-0583-x.
44. Motojima, H. Properties of fulvic acid extracted from excess sludge and its inhibiting effect on beta-hexosaminidase release / H. Motojima, P. Yamada, J. Han, M. Ozaki,

- H. Shigemori, H. Isoda // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2009. – V. 73. – P. 2210-2216. DOI: 10.1271/bbb.90316.
45. Snyman, J.R. Pilot Study to Evaluate the Safety and Therapeutic Efficacy of Topical Oxifulvic Acid in Atopic Volunteers / J.R. Snyman, J. Dekker, S.C.K. Malfeld, C.E.J. van Rensburg // *Drug Development Research*. – 2002. – V. 57. – P. 40-43. DOI: 10.1002/ddr.10116.
46. Pant, K. Shilajit: A humic matter panacea for cancer / K. Pant, B. Singh, N. Thakur // *International Journal of Toxicological And Pharmacological Research*. – 2012. – V. 4. – P. 17-25.
47. Huang, W.S. Fulvic acid attenuates resistin-induced adhesion of HCT-116 colorectal cancer cells to endothelial cells / W.-S. Huang, J.-T. Yang, C.-C. Lu, S.-F. Chang, C.-N. Chen, Y.-P. Su, K.-C. Lee // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – V. 16. – P. 29370-29382. DOI: 10.3390/ijms161226174.
48. Jayasooriya, R.G.P.T. Fulvic acid promotes extracellular anti-cancer mediators from RAW 264.7 cells, causing to cancer cell death *in vitro* / R.G.P.T. Jayasooriya, M.G. Dilshara, C.-H. Kang, S. Lee, Y.H. Choi, Y.K. Jeong, G.-Y. Kim et al. // *International Immunopharmacology*. – 2016. – V. 36. – P. 241-248. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.029.
49. Zhou, P. Competitive complexation of metal ions with humic substances / P. Zhou, H. Yan, B. Gu // *Chemosphere*. – 2005. – V. 58. – P. 1327-1337. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.017.
50. Güngör, E.B.O. Zinc release by humic and fulvic acid as influenced by pH, complexation and DOC sorption / E.B.O. Güngör, M. Bekbölet // *Geoderma*. – 2010. – V. 159. – P. 131-138. DOI: 10.1016/j.geoderma.2010.07.004.
51. Terdkiatburana, T. Competition and complexation of heavy metal ions and humic acid on zeolitic MCM-22 and activated carbon / T. Terdkiatburana, S. Wang, M.O.

- Tadé // *Chemical Engineering Journal*. – 2008. – V. 139. – P. 437-444. DOI: 10.1016/j.cej.2007.08.005.
52. Boguta, P. Zinc Binding to Fulvic acids: Assessing the Impact of pH, Metal Concentrations and Chemical Properties of Fulvic Acids on the Mechanism and Stability of Formed Soluble Complexes / P. Boguta, Z. Sokołowska // *Molecules*. – 2020. – V. 25. DOI: 10.3390/molecules25061297.
53. Van Dijk, H. Cation binding of humic acids / H. van Dijk // *Geoderma*. – 1971. – V. 5. – P. 53-67. DOI: 10.1016/0016-7061(71)90024-3.
54. Boguta, P. *Acta Agrophysica Monographiae*. Interactions of humic acids with metals / P. Boguta, Z. Sokołowska – Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Wydawnictwo, 2013. – P. 113. – ISBN 978-83-89969-12-5.
55. Zharebtsov, S.I. Sorption of copper cations from aqueous solutions by brown coals and humic acids / S.I. Zharebtsov, N.V. Malysenko, L.V. Bryukhovetskaya, S.Y. Lyrshchikov, Z.R. Ismagilov // *Solid Fuel Chemistry*. – 2015. – V. 49. – P. 294-303. DOI: 10.3103/S0361521915050110.
56. Binkiene, R. Interaction of Metallic Iron with Solutions Containing Humic Acids and Cu (II) / R. Binkiene, O. Gyliene, R. Ragauskas, V. Gerasimovas // *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*. – 2017. – V. 2. – P. 3139-3147. DOI: 10.22161/ijeab/2.6.47.
57. Olaniran, A.O. Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies / A.O. Olaniran, A. Balgobind, B. Pillay // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – V. 14. – P. 10198-10228. DOI: 10.3390/ijms140510197.
58. Campitelli, P.A. Chemical and physicochemical characteristics of humic acids extracted from compost, soil and amended soil / P.A. Campitelli, M.I. Velasco, S.B. Ceppi // *Talanta*. – 2006. – V. 69. – P. 1234–1239. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.12.048.

59. Adusei-Gyamfi, J. Natural organic matter-cations complexation and its impact on water treatment: A critical review / J. Adusei-Gyamfi, B. Ouddane, L. Rietveld, J.-P. Cornard, J. Criquet // *Water Research*. – 2019. – V. 160. – P. 130-147. DOI: 10.1016/j.watres.2019.05.064.
60. Орлов, Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / Д.С. Орлов. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 325 с. – ISBN 5-211-00934-7.
61. Орлов, Д.С. Гуминовые вещества в биосфере / Д.С. Орлов. — М.: Наука, 1993. — 237 с. — ISBN 5-02-003828-8.
62. Мартынова, Н. А. Химия почв: органическое вещество почв : учеб.-метод. пособие / Н. А. Мартынова. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2011. – 255 с. – ISBN 978-5-9624-0537-7.
63. Попов, А. И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование / Под ред. Е. И. Ермакова. — СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. — 248 с. – ISBN 5-288-03516-4.
64. Stevenson, F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions / F.J. Stevenson. – John Wiley & Sons, 1994. – P. 489. – ISBN 0-471-59474-1.
65. De Melo, B.A.G. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments / B.A.G. De Melo, F.L. Motta, M.H.A. Santana, M // *Materials Science and Engineering C*. – 2016. – V. 62. – P. 967-974. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001.
66. Jarukas, L. Determination of Organic Compounds, Fulvic Acid, Humic Acid, and Humic in Peat and Sapropel Alkaline Extracts / L. Jarukas, L. Ivanauskas, G. Kasparaviciene, J. Barauskaite, M. Marksa, J. Bernatoniene // *Molecules*. – 2021. – V. 26. DOI: 10.3390/molecules26102995.
67. Mahler, C.F. Chemical Characteristics of Humic Substances in Nature / C.F. Mahler, N.D.S. Svierzoski, C.A.R. Bernardino // *Humic Substances*, Makan, A., Ed. – Intechopen, London, U.K., 2021. – P. 186. – ISBN 978-1839627514.

68. Alvarez-Puebla, R.A. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation: A molecular modelling approach / R.A. Alvarez-Puebla, C. Valenzuela-Calahorra, J.J. Garrido // *Science of The Total Environment*. – 2006. – V. 358. – P. 243-254. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.11.026.
69. Aiken, G.R. Molecular weight of aquatic fulvic acids by vapor pressure osmometry / G.R. Aiken, R.L. Malcom // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1987. – V. 51. – P. 2177-2184. DOI: 10.1016/0016-7037(87)90267-5.
70. Bezuglova, O. Molecular structure of humus acids in soils / O. Bezuglova // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. – 2019. – V. 182. – P. 676-682. DOI: 10.1002/jpln.201900043.
71. Samiosa, S. Structural investigations of aquatic humic substances from different watersheds / S. Samiosa, T. Lekkasa, A. Nikolaou, S. Golfinopoulos // *Desalination*. – 2007. – V. 210. – P. 125–137. DOI: 10.1016/j.desal.2006.05.038.
72. Kawahigashi, M. Size and shape of soil humic acids estimated by viscosity and molecular weight / M. Kawahigashi, H. Sumida, K. Yamamoto // *Journal of colloid and interface science*. – 2005. – V. 284. – N 2. – P. 463-469. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.10.023.
73. Liu, S. Removal of humic acid using TiO₂ photocatalytic process—Fractionation and molecular weight characterisation studies / S. Liu, M. Lim, R. Fabris, C. Chow, K. Chiang, M. Drikas, R. Amal // *Chemosphere*. – 2008. – V. 72. – N 2. – P. 263-271. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.01.061.
74. Thorsten, R. Comparative Investigation of Low-Molecular-Weight Fulvic Acids of Different Origin by SEC-Q-TOF-MS: New Insights into Structure and Formation / R. Thorsten, A. These // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – V. 39. – N 10. – P. 3507–3512. DOI: 10.1021/es0480466.
75. Pena-Méndez, E.M. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine / E.M. Pena-

- Méndez, J. Havel, J. Patočka // *Journal of Applied Biomedicine*. – 2005. – V. 3. – P. 13-24.
76. Li, H. The role of major functional groups: Multi-evidence from the binding experiments of heavy metals on natural fulvic acids extracted from lake sediments / H. Li, J. Wang, B. Zhao, M. Gao, W. Shi, H. Zhou, Z. Xie, B. Zhou, C. Lü, J. He // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – V. 162. – P. 514-520. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.038.
77. Leenheer, J.A. Strong-acid, carboxyl-group structures in fulvic acid from the Suwannee River, Georgia. 1. Minor structures / J.A. Leenheer, R.L. Wershaw, M.M. Reddy // *Environmental Science & Technology*. – 1995. – V. 29. – N 2. – P. 393-398. DOI: 10.1021/es00002a015.
78. Ritchie, J.D. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter / J.D. Ritchie, E.M. Perdue // *Geochimica et cosmochimica acta*. – 2003. – V. 67(1). – P. 85-96. DOI: 10.1016/S0016-7037(02)01044-X.
79. Gong, G. Extraction of Fulvic Acid from Lignite and Characterization of Its Functional Groups / G. Gong, L. Xu, Y. Zhang, W. Liu, M. Wang, Y. Zhao, X. Yuan, Y. Li // *ACS Omega*. – 2020. – V. 5. – N 43. – P. 27953–27961. DOI: 10.1021/acsomega.0c03388.
80. Gong, G. Establishment of a molecular structure model for classified products of coal-based fulvic acid / G. Gong, Y. Zhao, Y. Zhang, B. Deng, W. Liu, M. Wang, X. Yuan, L. Xu // *Fuel*. – 2020. – V. 267. DOI: 10.1016/j.fuel.2020.117210.
81. Li, H. Characterization of humic acids and fulvic acids derived from sewage sludge / H. Li, Y. Li, C. Li // *Asian journal of chemistry*. – 2013. – V. 25. – N 18. DOI: 10.14233/ajchem.2013.15162.
82. Kiprop, A.K. Synthesis of humic and fulvic acids and their characterization using optical spectroscopy (ATR-FTIR and UV-Visible) / A.K. Kiprop, J. Marie-Camille,

- E. Pourtier, S. Kimutai, S. Kirui // *International Journal of Applied Science and Technology*. – 2013. – V. 3. – N 8.
83. Omar, M. Physicochemical characteristics of humic and fulvic acids extracted from different feedstocks / M. Omar, A. Taha, A. Abbas // *Journal of Soil Sciences and Agricultural Engineering*. – 2018. – V. 9. – N 7. – P. 277-281. DOI: 10.21608/jssae.2018.35767.
84. Lawrence, J. Humic acid and related substances in the environment // *Analysis of trace organics in the aquatic environment*. – CRC Press. – 2017. – P. 313-337.
85. Gong, G. Characterization of coal-based fulvic acid and the construction of a fulvic acid molecular model / G. Gong, X. Yuan, Y. Zhang, Y. Li, W. Liu, M. Wang, Y. Zhao, L. Xu // *RSC Advances*. – 2020. – V. 10. – P. 5468-5477. DOI: 10.1039/C9RA09907G.
86. Thorsten, R. Differences in the molecular composition of fulvic acid size fractions detected by size-exclusion chromatography–on line Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR–) mass spectrometry / R. Thorsten, A. These, A. Springer, M. Linscheid // *Water Research*. – 2008. – V. 42. – P. 63-72. DOI: 10.1016/j.watres.2007.06.063.
87. Gnananath, K. Exploration of fulvic acid as a functional excipient in line with the regulatory requirement / K. Gnananath, K.S. Nataraj, B.G. Rao, K.P Kumar, M.H. Mahnashi, M.K. Anwer, A. Umar, Z. Iqbal, M.A. Mirza // *Environmental Research*. – 2020. – V. 187. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109642.
88. Fulvic Acid (CAS Number: 479-66-3) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.caymanchem.com/product/19063/fulvic-acid>.
89. Litvin, V.A. Synthesis and properties of synthetic fulvic acid derived from hematoxylin / V.A. Litvin, B.F. Minaev, G.V. Baryshnikov // *Journal of Molecular Structure*. – 2015. – V. 1086. – P. 25-33. DOI: 10.1016/j.molstruc.2014.12.091.

90. Aranganathan, L. Spectral and microscopic analysis of fulvic acids isolated from marine fish waste and sugarcane bagasse co-compost / L. Aranganathan, S.R. Radhika Rajasree, K. Govindaraju, S. Sivarathna kumar, S. Gayathri, R.R. Remya, T.Y. Suman // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – V. 29. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101762.
91. Wang, Z. Fulvic acid-like substance and its characteristics, an innovative waste recycling material from pulp black liquor / Z. Wang, T. Shen, Y. Yang, B. Gao, Y. Wan, Y.C. Li, Y. Yao, L. Liu, Y. Tang, J. Xie, F. Ding, J. Chen // *Journal of Cleaner Production*. – 2020. – V. 243. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118585.
92. Litvin, V.A. Synthetic Fulvic acids from Tannin / V. A. Litvin, R. Abi Njoh // *Journal of Chemistry and Technologies*. – 2020. – V. 28. – N 3. – P. 251-259. DOI: 10.15421/082027.
93. Wunderwald, U. Formation and degradation of a synthetic humic acid derived from 3-fluorocatechol / U. Wunderwald, G. Kreisel, M. Braun, M. Schulz, C. Jäger, M. Hofrichter // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2000. – V. 53. – P. 441-446. DOI: 10.1007/s002530051639.
94. Anielak, A.M. Innovative Method of Extraction of Humic Substances from Digested Sludge and Assessment of the Impact of Their on the Growth of Selected Plants / A.M. Anielak, A. Kłeczek, B. Łuszczek // *Energies*. – 2023. – V. 16. DOI: 10.3390/en16031283.
95. International Humic Substances Society 2024 Products [Электронный ресурс]. – International Humic Substances Society (IHSS). – 2024. – Режим доступа: <https://humicsubstances.org/product-checkout/>.
96. Фрид, А.С. Унифицированный образец гуминовых кислот чернозема: изготовление, внутрилабораторная и межлабораторная метрологическая характеристика состава / А.С. Фрид, В.А. Холодов, И.В. Перминова, Н.В.

- Ярославцева, Н.А. Куликова, Ю.Р. Фарходов, Б.М. Когут // *Агрохимия*. – 2022. – N 11. – С. 80-93. DOI: 10.31857/S0002188122110060.
97. Zherebker, A. Speciation of organosulfur compounds in carbonaceous chondrites / A. Zherebker, Y. Kostyukevich, D.S. Volkov, R.G. Chumakov, L. Friederici, C.P. Rüger, A.y Kononikhin, O. Kharybin, A. Korochantsev, R. Zimmermann, I.V. Perminova, E. Nikolaev // *Scientific reports*. – 2021. – V. 11. DOI: 10.1038/s41598-021-86576-6.
98. Xiaoli, C. Characterization of humic and fulvic acids extracted from landfill by elemental composition, ^{13}C CP/MAS NMR and TMAH-Py-GC/MS / C. Xiaoli, T. Shimaoka, G. Qiang, Z. Youcai // *Waste Management*. – 2008. – V.28. – N 5. – P. 896-903. DOI: 10.1016/j.wasman.2007.02.004.
99. Yang, Y. Variation in humic and fulvic acids during thermal sludge treatment assessed by size fractionation, elementary analysis, and spectroscopic methods / Y. Yang, H. Li, J. Li // *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. – 2014. – V. 8. – P. 854-862. DOI: 10.1007/s11783-014-0755-9.
100. Keeler, C. Quantitation in the solid-state ^{13}C NMR analysis of soil and organic soil fractions / C. Keeler, G.E. Maciel // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V. 75. – P. 2421-2432. DOI: 10.1021/ac020679k.
101. Helal, A.A. Characterization of different humic materials by various analytical techniques / A.A. Helal, G.A. Murad G. A. // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2011. – V. 4. – P. 51-54. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.06.018.
102. Votolin, K.S. Composition of humic and fulvic acids from lignite / K.S. Votolin, S.I. Zherebtsov, K.M. Shpakodraev, N.V. Malysenko, Z.R. Ismagilov // *Coke and Chemistry*. – 2022. – V. 65. – P. 191-200. DOI: 10.3103/S1068364X22050040.
103. Rodríguez, F.J. Characterization of aquatic humic substances / F.J. Rodríguez, L.A. Núñez // *Water and Environment Journal*. – 2011. – V. 25. – P. 163-170. DOI: 10.1111/j.1747-6593.2009.00205.x.

104. Jouraiphy, A. Structural study of the fulvic fraction during composting of activated sludge–plant matter: Elemental analysis, FTIR and ^{13}C NMR / A. Jouraiphy, S. Amir, P. Winterton, M. El Gharous, J.C. Revel, M. Hafidi // *Bioresource Technology*. – 2008. – V. 99. – N 5. – P. 1066-1072. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.02.031.
105. Machado, W. Spectroscopic characterization of humic and fulvic acids in soil aggregates, Brazil / W. Machado, J.C. Franchini, M. de Fátima Guimarães, J. Tavares Filho, J. // *Heliyon*. – 2020. – V. 6. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04078.
106. Bratskaya, S. Charge characteristics of humic and fulvic acids: Comparative analysis by colloid titration and potentiometric titration with continuous pK-distribution function model / S. Bratskaya, A. Golikov, T. Lutsenko, O. Nesterova, V. Dudarchik // *Chemosphere*. – 2008. – V. 73. – P. 557-563. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.014.
107. Driver, S.J. Acidic functional groups of Suwannee River natural organic matter, humic acids, and fulvic acids / S.J. Driver, E.M. Perdue // *Advances in the Physicochemical Characterization of Dissolved Organic Matter: Impact on Natural and Engineered Systems*. – American Chemical Society. – 2014. – P. 75-86. DOI: 10.1021/bk-2014-1160.ch004.
108. Melnikova, N. The Humic Acids of Peat. Physico-Chemical Properties and Biological Activity in Erythrocytes / N. Melnikova, O. Solovjeva, O. Vorobyova, et al. // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* – 2017. – V. 45. – N 2. – P. 278-285.
109. Yee, M.M., Study of ionic surfactants binding to humic acid and fulvic acid by potentiometric titration and dynamic light scattering / M.M. Yee, T. Miyajima, N. Takisawa // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2009. – V. 347. – P. 128-132. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.02.010.
110. Schellekens, J. Molecular features of humic acids and fulvic acids from contrasting environments // J. Schellekens, P. Buurman, K. Kalbitz, A. Zomerren, P.

- Vidal-Torrado, C. Cerli, R.N.J. Comans / *Environmental Science & Technology*. – 2017. – V. 51. – P. 1330-1339. DOI: 10.1021/acs.est.6b03925.
111. Wu, F.C. Rapid quantification of humic and fulvic acids by HPLC in natural waters / F.C. Wu, R.D. Evans, P.J. Dillon, Y.R. Cai // *Applied Geochemistry*. – 2007. – V. 22. – P. 1598-1605. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2007.03.043.
112. Ghosh, K. Fluorescence Excitation Spectra of Humic Substances / K. Ghosh, M. Schnitzer // *Canadian Journal of Soil Science*. - 1980. - V. 60. - P. 373-379. DOI: 10.4141/cjss80-040.
113. Miano T.M. Fluorescence spectroscopy of humic substances / T.M. Miano, J.P. Martin, G. Sposito // *Soil Science Society of America Journal*. – 1988. – V. 52. – P. 1016-1019. DOI: 10.2136/sssaj1988.03615995005200040021x.
114. Bertoncini, E. I. Fluorescence analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian oxisols as affected by biosolid amendment / E.I. Bertoncini, N. Senesi, V. D’Orazio // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2005. – V. 381. – P. 1281-1288. DOI: 10.1007/s00216-005-3054-2.
115. Gao, J.F. Structural Analysis of Humic Acid in Soil at Different Corn Straw Returning Modes through Fluorescence Spectroscopy and Infrared Spectroscopy / J.F. Gao, S. Dou, Z.G. Wang // *International Journal of Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 2019. DOI: 10.1155/2019/1086324.
116. Klavins, M. Spectrofluorimetric study of dissolved organic matter in River Salaca (Latvia) basin waters / M. Klavins, I. Kokorite, L. Ansone, L. Eglite, V. Rodinov, G. Springe // *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst*. – 2012. – V. 404. DOI: 10.1051/kmae/2011086.
117. Sun, X. Optical Properties of the Suwannee River Fulvic Acid Complexation with Thorium Using 3D Fluorescence Spectroscopy / X. Sun, X. Ma, L. Leng, Y. Fang // *Spectroscopy*. – 2022. – V. 37. – N 8. – P. 26-33. DOI: 10.56530/spectroscopy.xl4975e8.

118. Song, F. Fluorescence regional integration and differential fluorescence spectroscopy for analysis of structural characteristics and proton binding properties of fulvic acid sub-fraction / F. Song, F. Wu, W. Feng, Z. Tang, J.P. Giesy, F. Guo, D. Shi, X. Liu, N. Qin, B. Xing, Y. Bai // *Journal of Environmental Sciences*. – 2018. – V. 74. – P. 116-125. DOI: 10.1016/j.jes.2018.02.015.
119. Duarte, R.M.B.O. Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent / R.M.B.O. Duarte, E.B.H. Santos, A.C.S. Duarte // *Water Research*. – 2003. – V. 37. – P. 4073-4080. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00411-1.
120. Ma, X. Fractionation and spectroscopic properties of fulvic acid and its extract / X. Ma, S.A. Green // *Chemosphere*. – 2008. – V. 72. – P. 1425-1434. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.029.
121. Xu, Y. Resolving humic and fulvic acids in binary systems influenced by adsorptive fractionation to Fe-(hydr) oxide with focus on UV–Vis analysis / Y. Xu, Y. Bai, T. Hiemstra, W. Tan, L. Weng // *Chemical Engineering Journal*. – 2020. – V. 389. DOI: 10.1016/j.cej.2020.124380.
122. Klučáková, M. Size and Charge Evaluation of Standard Humic and Fulvic Acids as Crucial Factors to Determine Their Environmental Behavior and Impact // *Frontiers in Chemistry*. – 2018. – V. 6. DOI: 10.3389/fchem.2018.00235.
123. Esfahani, M.R. Abiotic reversible self-assembly of fulvic and humic acid aggregates in low electrolytic conductivity solutions by dynamic light scattering and zeta potential investigation / M.R. Esfahani, H.A. Stretz, M.J.M. Wells // *Science of the Total Environment*. – 2015. – V. 537. – P. 81-92. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.001.
124. Votolin, K.S. Lignite Fulvic Acids: Analysis by Dynamic Light Scattering / K.S. Votolin, O.S. Efimova, S.I. Zhrebtssov, K.M. Shpakodraev, N.V. Malysenko,

- Z.R. Ismagilov // *Coke and Chemistry*. – 2022. – V. 65. – P. 363-370. DOI: 10.3103/S1068364X22700016.
125. Bambalov, N.N. Separation of Components in the Group Analysis of the Organic Matter of Peat: A Review // *Solid Fuel Chemistry*. – 2020. – V. 54. – P. 280-298. DOI: 10.3103/S036152192005002X.
126. Ukalska-Jaruga, A. Particle and structure characterization of fulvic acids from agricultural soils / A. Ukalska-Jaruga, G. Debaene, B. Smreczak // *Journal of Soils and Sediments*. – 2018. – V. 18. – P. 2833-2843. DOI: 10.1007/s11368-018-2008-1.
127. Mu, D. Evolution from basic to advanced structure of fulvic acid and humic acid prepared by food waste / D. Mu, L. Mu, X. Geng, T.A. Mohamed, Z. Wei // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Geng. 256. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128413.
128. These, A. Structure-dependent reactivity of low molecular weight fulvic acid molecules during ozonation / A. These, T. Reemtsma // *Environmental science & technology*. – 2005. – V. 39. – P. 8382-8387. DOI: 10.1021/es050941h.
129. 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/sjmpps.2023.v09i09.004.
130. 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.
131. Uysal, B.Z. Production of Fulvic Acid via Ethyl Fulvate / B.Z. Uysal, Y.M. Sönmez, D. Uysal // *Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment*. – 2013. – P. 1101–1104. DOI: 10.1007/978-94-007-5634-2_204.

132. Song, G. Isolation and fractionation of soil humin using alkaline urea and dimethylsulphoxide plus sulphuric acid / G. Song, M.H.B. Hayes, E.H. Novotny, A.J. Simpson // *Naturwissenschaften*. – 2011. – V. 98. – P. 7-13. DOI: 10.1007/s00114-010-0733-4.
133. Nieweś, D. Ultrasound-Assisted Extraction of Humic Substances from Peat: Assessment of Process Efficiency and Products' Quality / D. Nieweś, M. Huculak-Mączka, M. Braun-Giwerska, K. Marecka, A. Tyc, M. Biegun, K. Hoffmann, J. Hoffmann // *Molecules*. – 2022. – V. 27. DOI: 10.3390/molecules27113413.
134. Shimizu, Y. Natural organic matter undergoes different molecular sieving by adsorption on activated carbon and carbon nanotubes / Y. Shimizu, M. Ateia, C. Yoshimura // *Chemosphere*. – 2018. – V. 203. – P. 345-352. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.197.
135. Ilavský, J. Removal of Humic Substances in Water by Granular Activated Carbon / J. Ilavský, D. Barloková, O. Kapusta // “Environmental Engineering” 10th International Conference. – 2017. – V. 10. DOI: 10.3846/enviro.2017.078.
136. Hu, M. Adsorption of fulvic acid on mesopore-rich activated carbon with high surface area / M. Hu, W. Wu, D. Lin, K. Yang // *Science of The Total Environment*. – 2022. – V. 838. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.155918.
137. Lee, M.C.Y. Humic substances removal by activated carbon / M.C.Y. Lee, V.L. Snoeyink. – University of Illinois at Urbana-Champaign, 1980. – P. 125.
138. Chi, M. Extraction and characterization of fulvic acid from corn straw compost by alkali solution acid precipitation / M. Chi, Z. Wang, W. Xu, R. Hou // *Industrial Crops and Products*. – 2023. – V. 198. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.116678.
139. Tripolskaja, L. Changes in Organic Carbon in Mineral Topsoil of a Formerly Cultivated Arenosol under Different Land Uses in Lithuania / L. Tripolskaja, A. Kazlauskaite-Jadzeviciene, E. Baksienė, A. Razukas // *Agriculture*. – 2022. – V. 12. DOI: 10.3390/agriculture12040488.

140. Camp, D. Analysis of Physicochemical Properties for Drugs of Natural Origin / D. Camp, A. Garavelas, M. Campitelli // *Journal of Natural Products*. – 2015. – V. 78. – N 6. – P. 1370–1382. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00255.
141. Wilson, E. Review on shilajit used in traditional Indian medicine / E. Wilson, G.V. Rajamanickam, G.P. Dubey, P. Klose, F. Musial, F.J. Saha, T. Rampp, A. Michalsen, G.J. Dobos // *Journal of Ethnopharmacolog.* – 2011. – V. 136. – P. 1-9. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.033.
142. Byung, Wan J. Development of functional nourishing cream using fulvic acid / Wan J. Byung, J. JunHo, L. Yunsung // *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. – 2017. – V. 12. – P. 47-58. DOI: 10.9790/3008-1203034758.
143. Zhang, Y. Transdermal delivery of inflammatory factors regulated drugs for rheumatoid arthritis / Y. Zhang, Z. Gao, S. Chao, W. Lu, P. Zhang // *Drug Delivery*. – 2022. – V. 29. – P. 1934-1950. DOI: 10.1080/10717544.2022.2089295.
144. Kandil, L.S. Galantamine transdermal patch shows higher tolerability over oral galantamine in rheumatoid arthritis rat model / L.S. Kandil, A.S. Hanafy, S.A. Abdelhady // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2020. – V. 46. – P. 996-1004. DOI: 10.1080/03639045.2020.1764025.
145. Zhang, Y. Spectroscopic Characteristics and Speciation Distribution of Fe(III) Binding to Molecular Weight-Dependent Standard Pahokee Peat Fulvic Acid / Y. Zhang, C. Liu, Y. Li, L. Song, J. Yang, R. Zuo, J. Li, Y. Teng, J. Wang // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – V. 19. DOI: 10.3390/ijerph19137838.
146. Криоскопический метод исследования [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://pnu.edu.ru/media/filer_public/2013/04/08/fiz-chem_lab6.pdf.
147. Ozawa, J. Morphological changes in hind limb muscles elicited by adjuvant-induced arthritis of the rat knee / J. Ozawa, T. Kurose, S. Kawamata, K. Yamaoka //

- Scand. J. Med. Sci. Sports. – 2010. – V. 20. – P. e72–e79. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2009.00900.x.
148. Mihara, M. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // *Anal Biochem.* – 1978. – V. 86. – N 1. – P. 271-278. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
149. Сирота, Т.В. Новый подход к изучению аутоокисления адреналина: возможность определения активности супероксиддисмутазы и антиоксидантных свойств различных препаратов методом полярографии / Т.В. Сирота // *Биомедицинская Химия.* – 2012. – N 58. – С. 77–87.
150. Aebi, H. Catalase *in vitro.* / H. Aebi // *Methods in Enzymology.* – 1984. – V. 105. – P. 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
151. Методы определения ред-окс статуса культивируемых клеток растений / Г.В. Сибгатуллина, Л.Р. Хартендинова, Е.А. Гумерова, А.Н. Акулов, Ю.А. Костюкова, Н.И. Румянцева ; Учеб.-метод. пособие к курсам магистратуры, К(П)ФУ. – Казань: Изд-во К(П)ФУ, 2011. – 61 с.
152. Соловьева, А.Г. Новый способ оценки динамики метаболизма крови у больных с термической травмой / А.Г. Соловьева, Ю.В. Зимин // *Современные технологии в медицине.* – 2012. – N 2. – С. 116–117.
153. Dawson, J.M. Lowry method of protein quantification evidence for photosensitivity / J.M. Dawson, P.L. Heatlic // *Anal. Biochem.* – 1984. – V. 140. – P. 391–393. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90183-0.
154. Guru, S.C. Methodological aspects of aldehyde dehydrogenase assay by spectrophotometric technique / S.C. Guru, K.T. Shetty // *Alcohol.* – 1990. – V. 7. – P. 397–401. DOI: 10.1016/0741-8329(90)90022-5.
155. Вершинин, В.И. Аналитическая химия / В.И. Вершинин, И.В. Власова, И.А. Никифорова; Учеб. для студ. учреждений высш. проф. образования –

- Москва : Издательский центр «Академия», 2011. – 448 с. – ISBN: 978-5-7695-6292-1.
156. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь, В.В. Долгов ; – Тверь : Издательство «Триада», 2014. – 218 с. – ISBN: 978-5-94789-611-4.
157. 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. – DOI 10.30906/2073-8099-2022-14-5-3-7.
158. Kolliphor P Grades. Technical Information. Poloxamers for Pharmaceutical Use. = Registered trademark of BASF Poloxamers Ph. Eur. [Электронный ресурс]. – Technical Information 03_111136e-03 WF No. 122937. – 2013. – Режим доступа: https://healthdocbox.com/Herbs_For_Health/74076380-Kolliphor-p-grades-technical-information-poloxamers-for-pharmaceutical-use-registered-trademark-of-basf-poloxamers-ph-eur.html.
159. Zahan, O.M. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis / O.M. Zahan, O. Serban, C. Gherman, D. Fodor // *Medicine Pharmacy Reports*. – 2020. – V. 93. – P. 12-22. DOI: 10.15386/mpr-1422.
160. Крыльский, Е. Д. Активность глутатионовой антиоксидантной системы и NADPH-генерирующих ферментов при экспериментальном ревматоидном артрите у крыс / Е. Д. Крыльский, Т. Н. Попова, Е. М. Кирилова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2015. – Т. 160. – N 7. – С. 30-33.
161. Крыльский, Е. Д. Параметры биохемилюминисценции в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите / Е. Д. Крыльский, Т. Н. Попова, Е. М. Кирилова // *Тенденции и инновации современной науки : материалы III Международной научно-практической конференции, Краснодар, 29 октября 2012 года*. – Краснодар: Научно-издательский центр Априори, 2012. – С. 46-47.

162. Шестакова, Т. Н. Активность каталазы в тканях крыс при действии 4-метилфенилбигуанида на фоне развития экспериментального ревматоидного артрита / Т. Н. Шестакова, Т. Н. Попова, О. А. Сафонова // Актуальные вопросы развития территорий: теоретические и прикладные аспекты : Сборник научных статей студентов, магистрантов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей. Том 2. – Пермь : ИП Сигитов Т.М., 2016. – С. 126-128.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Акты внедрения результатов диссертационной работы

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
«Приволжский исследовательский
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России)
Минина и Пожарского пл., 10/1,
г. Нижний Новгород, 603950, БОКС-470
тел.: (831) 422-12-50; факс: (831) 439-01-84
<http://pimunn.ru/>
e-mail: kanc@pimunn.net
ОКПО 01963025, ОГРН 1025203045482
ИНН/КПП 5260037940/526001001



« 16 » мая 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертации Конновой Марии Алексеевны на тему:
«Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвово́й кислоты,
извлечённой из торфа Нижегородской области»
на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности:
3.4.2. – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Учреждение, в котором внедрена работа: кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кем предложено: аспирантом кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Конновой Марией Алексеевной

Форма внедрения: результаты диссертационной работы М.А. Конновой «Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвово́й кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области» используются в научно-исследовательской и учебной работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии

Сроки внедрения: 2023 год

Эффективность внедрения: результаты диссертационной работы М.А. Конновой «Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвово́й кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области» активно используются в курсе обучения студентов III-V курсов фармацевтического факультета на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России

Зав. кафедрой фармацевтической химии
и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ»
Минздрава России, д.фарм.н., доцент



Жукова

О.В. Жукова



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Конновой Марии Алексеевны на тему:
«Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвово́й кислоты, извлечённой из торфа
Нижегородской области»

на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности:

3.4.2. – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

в научно-исследовательскую работу фармацевтического отделения государственного бюджетного
образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж»

Комиссия в составе к.п.н., заслуженного учителя РФ, преподавателя Т.Н. Поповой и к.х.н.,
заведующего практикой Е.С. Рыжовой подтверждает использование результатов, полученных
Конновой Марией Алексеевной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Выделение,
исследование и разработка подходов стандартизации фульвово́й кислоты, извлечённой из торфа
Нижегородской области» в научно-исследовательской и учебной работе фармацевтического отделения
государственного бюджетного образовательного учреждения Нижегородской области
«Нижегородский медицинский колледж»

к.п.н., заслуженный учитель РФ,
преподаватель

Т.Н. Попова

к.х.н., заведующий практикой

Е.С. Рыжова

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ
«НИЖЕГОРОДСКИЙ ОБЛАСТНОЙ ЦЕНТР
ПО КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА И
СЕРТИФИКАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ»
(ГАУЗ НОЦККСЛС)

ул. Геологов, д. 6, г. Нижний Новгород, 603141
тел.: (831) 466-70-55,
<http://www.nockkksls.nnov.ru>
e-mail: gauznockkksls@yandex.ru



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ГАУЗ НОЦККСЛС
к.фарм.н.,
И.В. Спицкая

« 06 » Сентября 2023 г

АКТ

о внедрении научных и практических результатов диссертационной работы
Конновой Марии Алексеевны на тему:
«Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвовой
кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области»

Комиссия в составе директора, к.фарм.н., И.В. Спицкой; начальника испытательной лаборатории Е.В. Митрофановой подтверждает апробацию и внедрение научных и практических результатов по стандартизации фульвовой кислоты, полученной Конновой Марией Алексеевной из низинного торфа Нижегородской области (месторождение «Альцевский Мох») в ходе работы над кандидатской диссертацией «Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвовой кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области», в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств».

Объектами внедрения являются:

- 1) Методики стандартизации, валидации, определения азота, оценки подлинности фульвовой кислоты методами ИК- и спектрофлуориметрического анализа.
- 2) Методика количественного определения фульвовой кислоты методом спектрофлуориметрии.

Ответственные за внедрение:

Директор, кандидат фармацевтических наук

 И.В. Спицкая

Начальник испытательной лаборатории

 Е.В. Митрофанова

**«ЭССОН»
Общество с ограниченной ответственностью
(ООО «ЭССОН»)**

607680, Нижегородская область, м. о. Кстовский, д. Кузьминка, ул. Чкалова, д. 165;
Тел.: +7 (831) 418-56-56



АКТ

**о внедрении научных и практических результатов диссертационной работы Конновой Марии Алексеевны на тему:
«Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвовой кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области»**

Комиссия в составе директора, к.т.н., Ю.Д. Шачнева; технолога С.А. Кирова подтверждает апробацию и внедрение научных и практических результатов диссертационной работы Конновой Марии Алексеевны в практику деятельности общества с ограниченной ответственностью «ЭССОН».

Объектами внедрения являются:

- 1) методика щелочной экстракции фульвовой кислоты из низинного торфа Нижегородской области (месторождение «Альцевский Мох»);
- 2) методики очистки и сушки фульвовой кислоты, полученной из низинного торфа Нижегородской области (месторождение «Альцевский Мох»).

Ответственный за внедрение:

Технолог

С.А. Киров

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Протоколы испытаний торфа от фирмы-производителя и фирмы-поставщика

Российская Федерация
Открытое акционерное общество
Нижегородская областная инспекция по качеству топлива и торфа «Инстоп»

Испытательная лаборатория ИЛ «Инстоп»
606400, г. Балахна, Нижегородской области, НиГРЭС, Инстоп

№ ST.RU.EXP.A0000571-2

Протокол действителен только для образцов, подвергнутых испытаниям.
Перепечатка и копирование без разрешения испытательной лаборатории запрещена.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 08-02

11-18 августа 2020г.

Продукции, поступившей от: ООО «Альцевское торфопредприятие».

Наименование продукции: Торф.

Техническое задание: Исследование торфа. Торфяное месторождение «Альцевский мох»
(сектор №10)

Результаты испытаний

№ п/п	Показатели	Обозначение	Единица измерений	Результаты испытаний	Обозначение ГОСТ
1.	Массовая доля общей влаги в рабочем состоянии	W_t^r	%	56,4	11305-2013
2.	Зольность	A^d	%	12,8	11306-2013
3.	Масса органического вещества		%	38,0	
4.	Кислотность	pH	(pH _{ксл})	5,5	11623-89
5.	Степень разложения	R	%	37	28245-89
6.	Вид торфа			Осоковый	28245-89
7.	Тип торфа			Низинный	28245-89
8.	Содержание фосфора	P_2O_5	%	0,02	27894-88
9.	Содержание азота	NH_4+NO_3	%	0,04	27894-88
10.	Содержание калия	K_2O	%	0,26	27894-88
11.	Содержание кальция	CaO	%	1,4	27894-88
12.	Содержание железа	Fe_2O_3	%	0,62	27894-88
13.	Массовая концентрация гуминовых кислот		г/л	0,4	MP

Руководитель



Г.К. Березина

**ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ЦЕНТРА АГРОХИМИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ "НИЖЕГОРОДСКИЙ"**

603107 г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 97
Телефон: 8 (831) 466-56-61

УТВЕРЖДАЮ:
Начальник ИЦ
ФГБУ ЦАС «Нижегородский»
З.В. Веденева
«25» декабря 2019 г.

**РЕЗУЛЬТАТ ИСПЫТАНИЙ
№689 от «25» декабря 2019 года**
(всего страниц 1 на 1 листе)

1. Наименование объекта исследования - торф низинный
2. Шифр образца – 6025
3. Предъявитель образцов - Индивидуальный предприниматель Шачнев Ю.Д.
4. Юридический адрес представителя - Нижегородская область, м.о. Кстовский, д. Кузьминка, ул. Чкалова, д. 165
5. Место отбора проб - Нижегородская обл., Тоншаевский район, д. Пурлы
6. Номер партии, объем -
7. Количество образцов, масса - 1 образец, 1,5 кг.
8. Основания для проведения испытаний - заявка на проведение испытаний от 12.12.2019 г., акт приема-передачи образцов от 12.12.2019 г.
9. Дата получения образца - 12.12.2019 г.
10. Дата проведения испытаний - начало 12.12.2019 г., окончание 23.12.2019 г.
11. На соответствие требованиям -
12. Условия окружающей среды: температура воздуха: +(22,0-24,4)°С, относительная влажность воздуха: (33,0 – 52,4)%
13. Результаты испытаний приведены в таблице:

№ п/п	Наименование показателя	Единицы измерения	Результат испытания	Нормы по НД	НД на методы испытаний
1	2	3	4	5	6
1.	Нефтепродукты	мг/г	0,03	-	ПНД Ф 16.1:2.21-2012
2.	Ртуть (валовая форма)	мкг/г	менее 0,1	-	ПНД Ф 16.1:2.3:3.10-98
3.	Кобальт	%	0,0002	-	СТ СЭВ 3364-81 п.3
4.	Молибден	%	менее 0,01	-	СТ СЭВ 3367-81 п.3
5.	Марганец	%	0,27	-	СТ СЭВ 3366-81 п.3
6.	Бенз(а)пирен	мг/кг	менее 0,005	-	ПНД Ф 16.:2:2.2:3.39-2003
7.	Сера (подвижная форма)	мг/кг	47,5	-	ГОСТ 26490-85

Используемое оборудование: Весы электронные лабораторные ACCULAB ALC-110d4 спектрофотометр атомно-абсорбционный с ртуть-гидридной приставкой ZEE nit 700P, анализатор жидкости люминесцентно-фотометрический «Флюорат-02-5М», Хроматограф жидкостной «Люмахром» с флюориметрическим детектором, весы лабораторные электронные CE, весы электронные MWP, спектрофотометр UNICO модель 1201.

Дополнительные сведения (указываются по необходимости)

Результаты исследования распространяются на образец продукции, предоставленный Заказчиком на испытания.

Запрещается перепечатка результата без разрешения испытательного центра.

Начальник отдела – зав. лабораторией  М.В. Тетерина

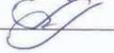
1	2	3	4	5	6
11.	Цезий-137	Бк/кг	менее 1,0	-	Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного гамма-спектрометра с программным обеспечением «Прогресс». Свидетельство об аттестации № 40090.3Н700 от 22.12.2003 ГНМЦ «ВНИИФТРИ»
12.	Стронций-90	Бк/кг	менее 0,1	-	Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного бета-спектрометра с программным обеспечением «Прогресс». Свидетельство об аттестации № 40090.4Г006 от 29.03.2004 ГНМЦ «ВНИИФТРИ»
13.	Медь	мг/кг	4,8	-	ГОСТ Р 53218-2008
14.	Цинк	мг/кг	20,9	-	ГОСТ Р 53218-2008
15.	Кадмий	мг/кг	0,10	-	ГОСТ Р 53218-2008
16.	Свинец	мг/кг	4,64	-	ГОСТ Р 53218-2008
17.	Никель	мг/кг	9,30	-	ГОСТ Р 53218-2008
18.	Хром	мг/кг	менее 0,1	-	ГОСТ Р 53218-2008
19.	Мышьяк	%	менее 0,0005	-	ГОСТ 10478-93

Используемое оборудование: Спектрофотометр UNICO модель 1201, спектрофотометр атомно-абсорбционный с ртуть-гидридной приставкой ZEE nit 700P, спектрофотометр UNICO модель 2100, спектрофотометр КФК-ЗКМ, пламенный фотометр ПФА-378, спектрофотометр атомно-абсорбционный AA-6300 SHIMADZU, анализатор жидкости люминесцентно-фотометрический «Флюорат-02-5М», анализатор жидкости лабораторный Анион – 4100, установка спектрометрическая «Мультирад» МКС-01А, весы лабораторные ВЛГЭ, весы электронные лабораторные ACCULAB ALC-110d4, Весы фасовочные электронные M-ER 326С, сушильный шкаф ШС-80-01 МК СПУ, весы лабораторные электронные СЕ, муфельная печь ПМ8.

Дополнительные сведения (указываются по необходимости).- * переименованный ГОСТ 10478-75

Результаты исследования распространяются на образец продукции, предоставленный заказчиком на испытания.

Запрещается перепечатка протокола без разрешения испытательного центра.

Начальник отдела – зав. лабораторией  М.В. Тетерина

Окончание протокола

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

**Разработки и оптимизации составов трансдермальных пластырей
методом Response Surface**

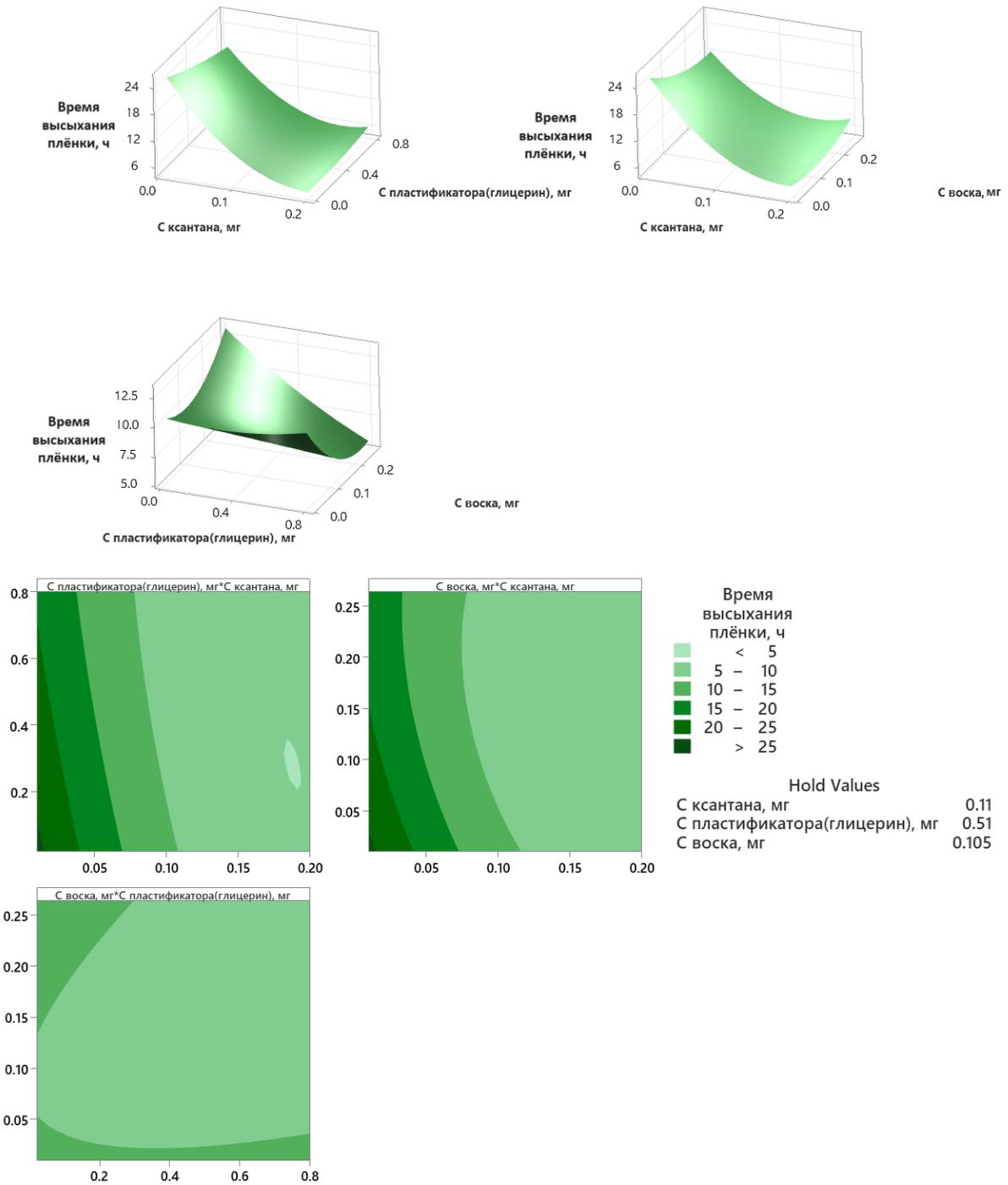


Рисунок 21. Влияние количеств ксантана, глицерина и воска на время высыхания плёнок (представлено графиками поверхности и контурными графиком)

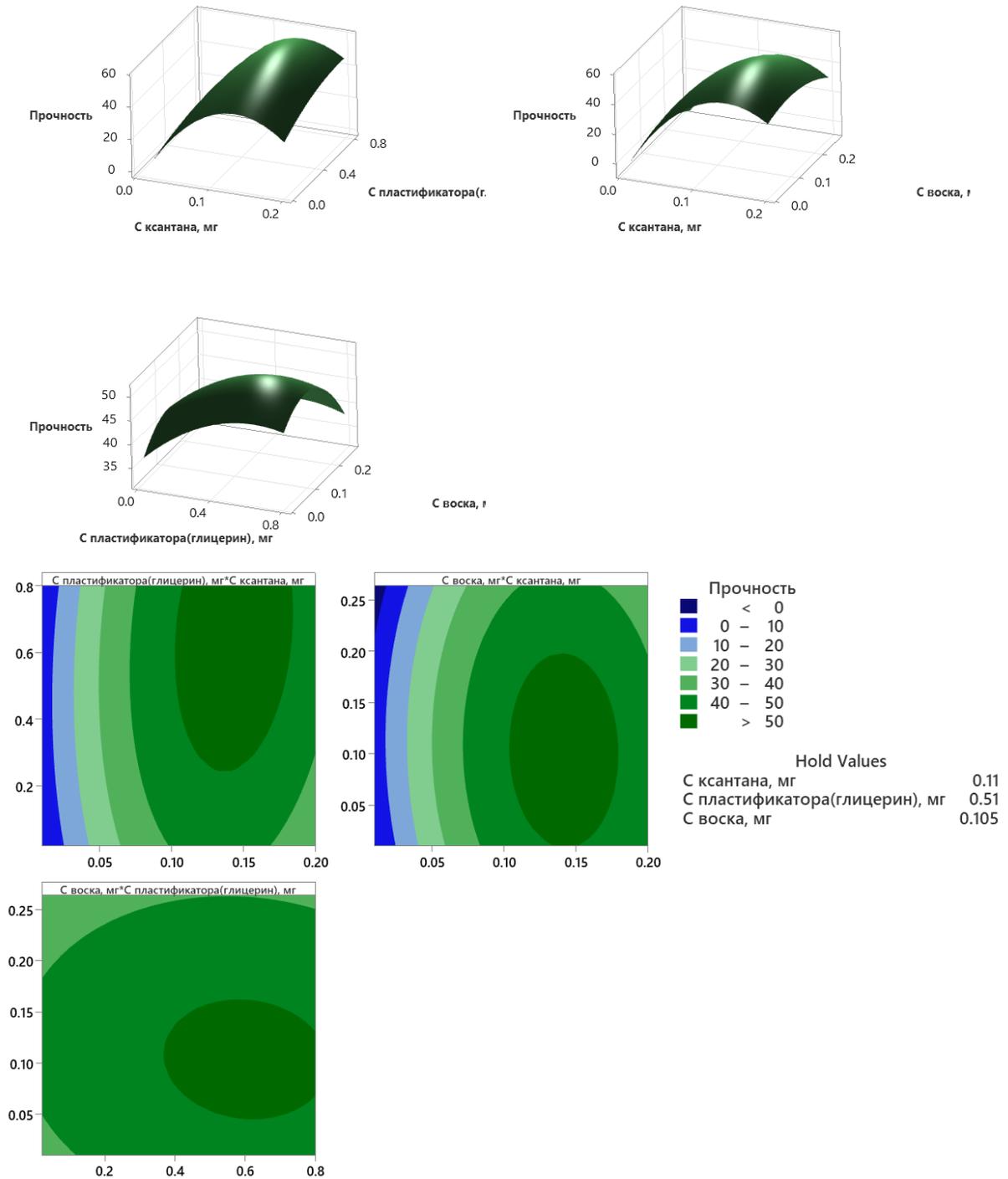


Рисунок 22. Влияние количеств ксантана, глицерина и воска на прочность плёнок (представлено графиками поверхности и контурными графиком)

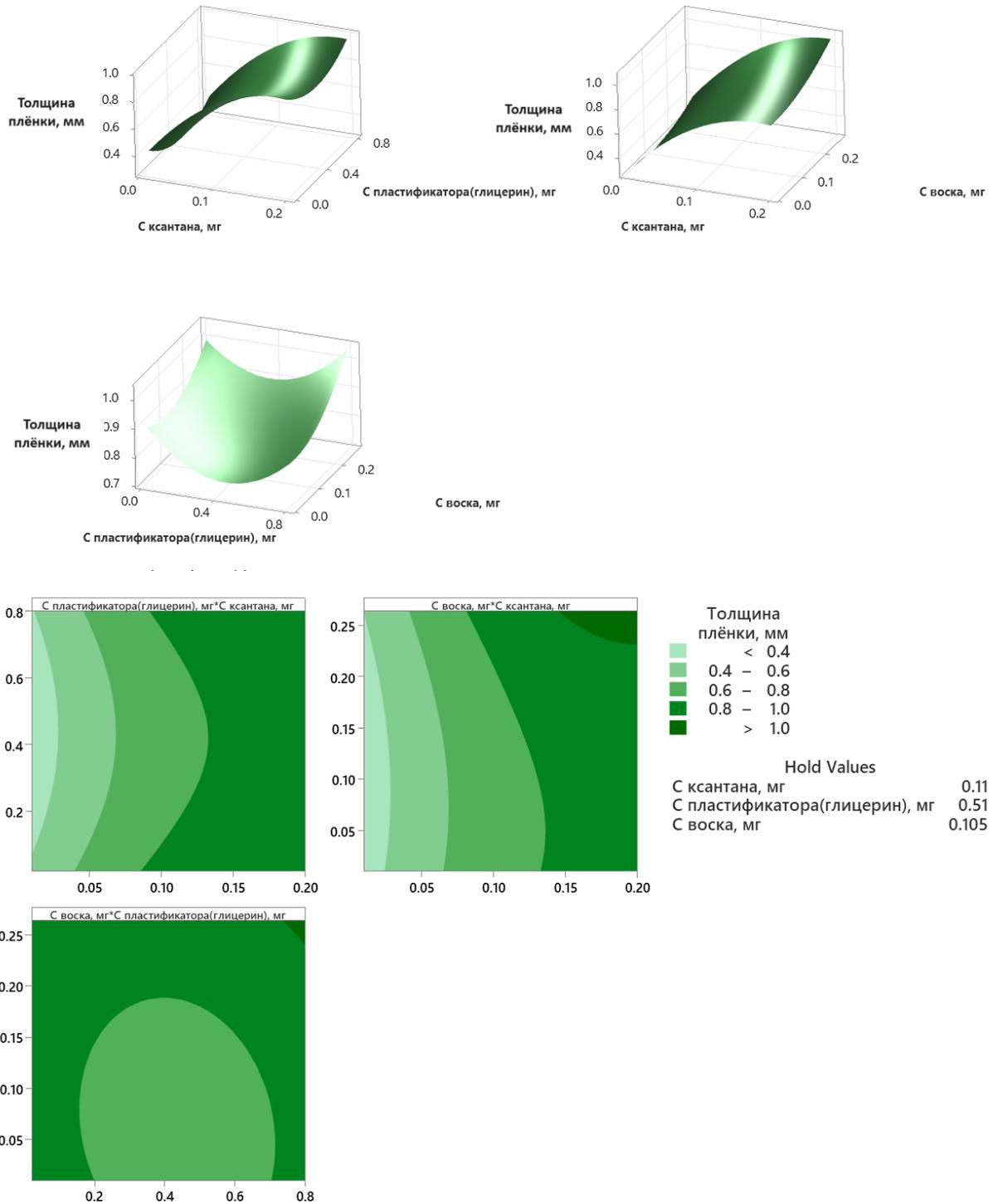


Рисунок 23. Влияние количеств ксантана, глицерина и воска на толщину плёнок (представлено графиками поверхности и контурными графиками)

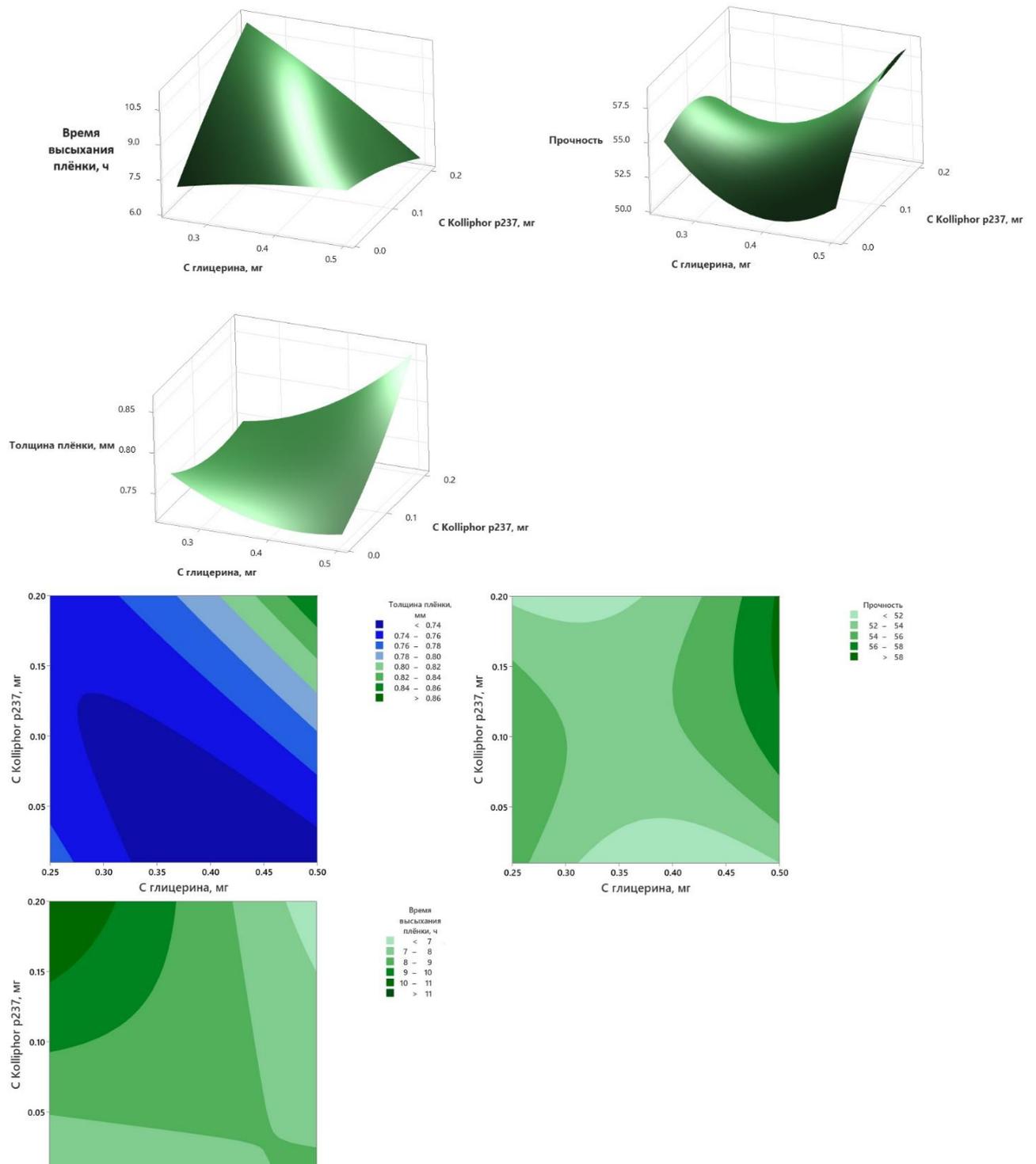


Рисунок 24. Влияние количеств плуроника Kolliphor p237 на толщину плёнки, её прочность и время высыхания (представлено графиками поверхности и контурными графиком)

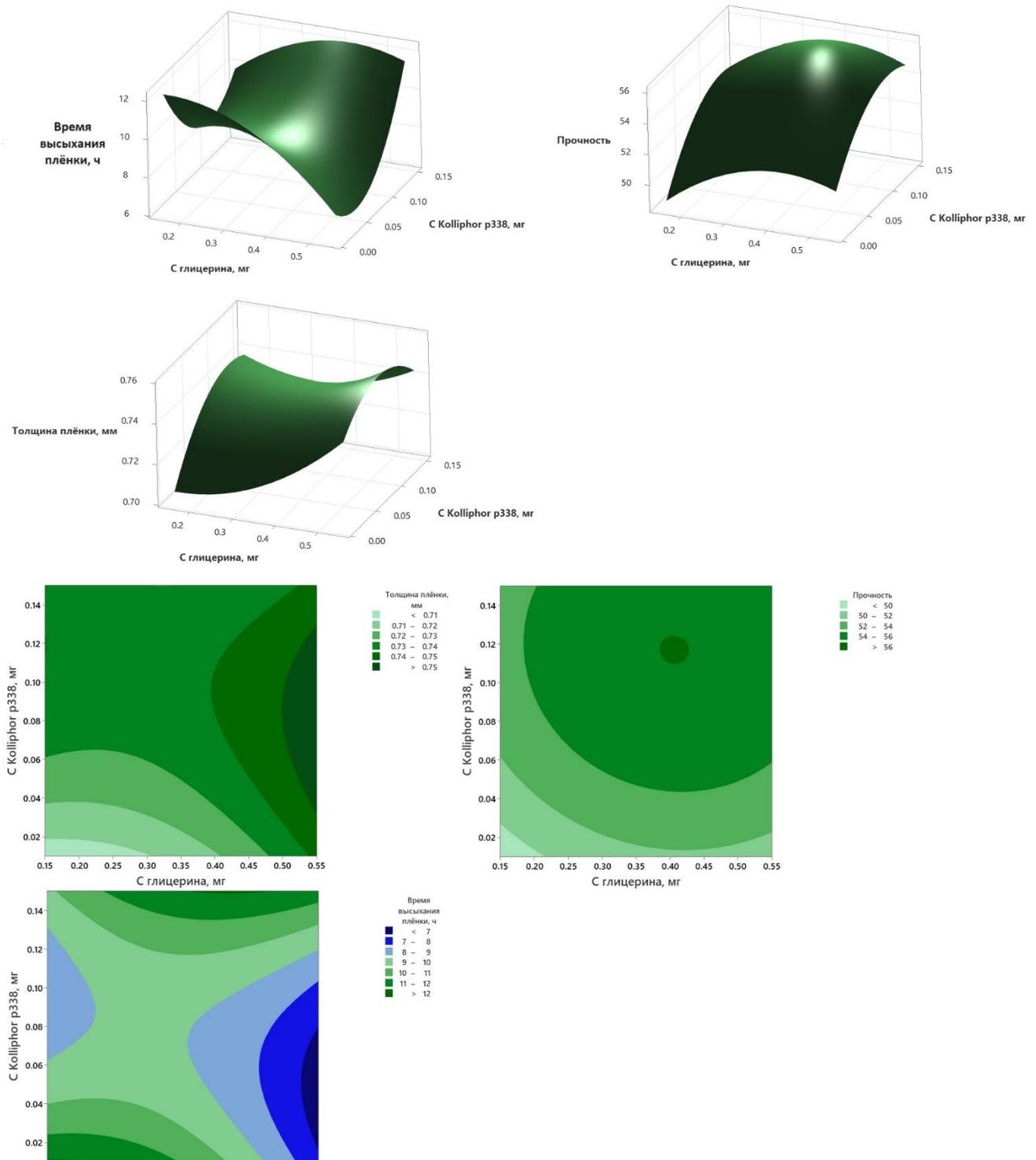


Рисунок 25. Влияние количеств плуроника Kolliphor p338 на толщину плёнки, её прочность и время высыхания (представлено графиками поверхности и контурными графиками)

Таблица 20. Статистические параметры, полученные ANOVA анализом

Параметры (независимые переменные)	R-sq	Adj R-sq	F-Values	P-Values
Концентрация ксантана				
Время высыхания плёнки, ч	99,91%	99,82%	1026,45	0,000
Прочность плёнки	99,03%	98,02%	238,88	0,000
Толщина плёнки, мм	99,81%	99,48%	303,82	0,000
Концентрация пластификатора				
Время высыхания плёнки, ч	98,92%	96,81%	216,89	0,000
Прочность плёнки	98,08%	96,43%	181,56	0,001
Толщина плёнки, мм	99,02%	98,01%	267,91	0,000
Концентрация воска				
Время высыхания плёнки, ч	99,21%	99,08%	511,23	0,000
Прочность плёнки	99,08%	98,84%	475,35	0,000
Толщина плёнки, мм	98,01%	96,57%	106,16	0,001
Концентрация Kolliphor p237				
Время высыхания плёнки, ч	99,44%	98,42%	886,87	0,000
Прочность плёнки	98,34%	97,13%	168,43	0,001
Толщина плёнки, мм	99,10%	98,51%	298,52	0,000
Концентрация Kolliphor p338				
Время высыхания плёнки, ч	98,78%	97,33%	197,25	0,001
Прочность плёнки	99,29%	98,72%	508,38	0,000
Толщина плёнки, мм	99,73%	98,46%	964,85	0,000

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

**Технологическая схема приготовления трансдермального пластыря
базового состава**

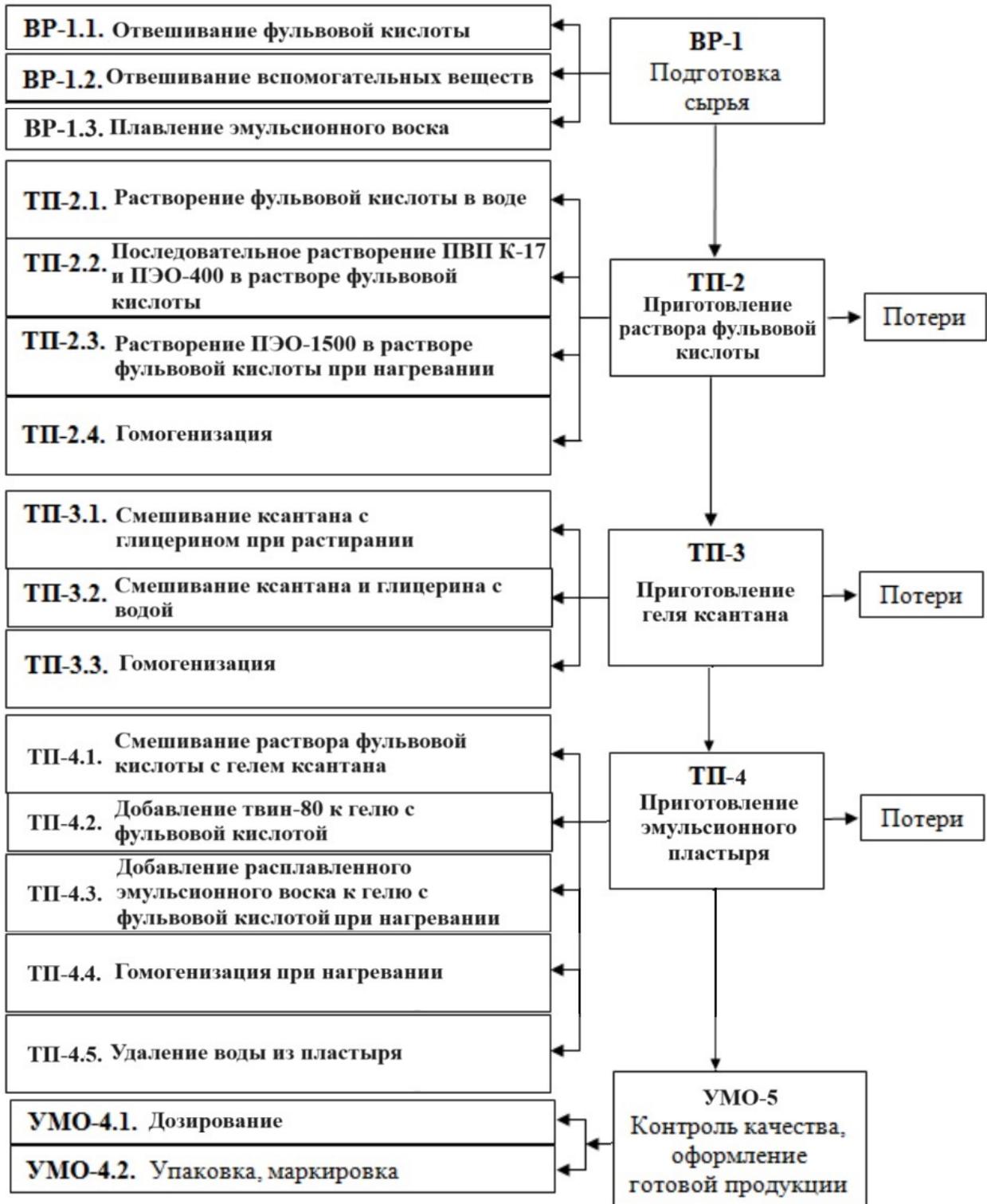


Рисунок 26. Технологическая схема приготовления трансдермального пластыря базового состава

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

**Статистическая обработка результатов высвобождения согласно
ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического
эксперимента**

Таблица 21(а). Серия опытов для оценки высвобождения фульвовой кислоты из состава с Kolliphor p237

Время отбора пробы (t, мин)	Содержание ФК, высвободившееся, из образца с Kolliphor p237 (x_i , г/мл)					Средние значения (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)	Относительная погрешность среднего (ϵ_{cp} , %)
	1	2	3	4	5			
15	0,0011	0,0011	0,0012	0,0012	0,0013	0,0012	$\pm 0,0002$	14,5861
30	0,0011	0,0012	0,0012	0,0013	0,0013	0,0012	$\pm 0,0002$	14,1079
60	0,0030	0,0030	0,0031	0,0031	0,0032	0,0031	$\pm 0,0002$	5,5882
90	0,0034	0,0035	0,0036	0,0036	0,0037	0,0036	$\pm 0,0002$	6,5886
120	0,0037	0,0038	0,0038	0,0040	0,0040	0,0039	$\pm 0,0003$	7,1503
150	0,0046	0,0047	0,0048	0,0050	0,0051	0,0048	$\pm 0,0004$	8,8138
180	0,0053	0,0054	0,0055	0,0055	0,0056	0,0055	$\pm 0,0002$	4,2959
240	0,0057	0,0058	0,0058	0,0059	0,0060	0,0058	$\pm 0,0002$	4,0164
300	0,0060	0,0060	0,0061	0,0062	0,0063	0,0061	$\pm 0,0003$	4,3827
360	0,0067	0,0068	0,0069	0,0070	0,0071	0,0069	$\pm 0,0003$	4,7140
420	0,0069	0,0070	0,0070	0,0071	0,0072	0,0070	$\pm 0,0002$	3,3317
435	0,0077	0,0079	0,0080	0,0081	0,0082	0,0080	$\pm 0,0004$	4,9587
450	0,0078	0,0080	0,0080	0,0080	0,0081	0,0080	$\pm 0,0002$	2,8240
465	0,0079	0,0080	0,0080	0,0081	0,0082	0,0080	$\pm 0,0002$	2,9173
480	0,0079	0,0080	0,0080	0,0081	0,0082	0,0080	$\pm 0,0002$	2,9173

Таблица 21(б). Серия опытов для оценки высвобождения фульвовой кислоты из состава с Kolliphor p338

Время отбора пробы (t, мин)	Содержание ФК, высвободившееся, из образца с Kolliphor p338 (x_i , г/мл)					Средние значения (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)	Относительная погрешность среднего (ϵ_{cp} , %)
	1	2	3	4	5			
15	0,0011	0,0011	0,0011	0,0012	0,0013	0,0012	$\pm 0,0002$	15,8621
30	0,0011	0,0012	0,0014	0,0014	0,0015	0,0013	$\pm 0,0003$	25,6083
60	0,0020	0,0022	0,0022	0,0023	0,0024	0,0022	$\pm 0,0003$	13,7446
90	0,0020	0,0023	0,0024	0,0024	0,0025	0,0023	$\pm 0,0004$	17,0563
120	0,0022	0,0023	0,0024	0,0025	0,0026	0,0024	$\pm 0,0003$	13,5529
180	0,0027	0,0028	0,0029	0,0030	0,0031	0,0029	$\pm 0,0003$	11,2162
240	0,0029	0,0030	0,0032	0,0033	0,0034	0,0032	$\pm 0,0004$	13,4996
300	0,0038	0,0039	0,0039	0,0040	0,0041	0,0039	$\pm 0,0002$	5,9532
360	0,0039	0,0041	0,0042	0,0043	0,0045	0,0042	$\pm 0,0005$	10,9524

Продолжение таблицы 21(б)

390	0,0042	0,0042	0,0043	0,0044	0,0045	0,0043	±0,0003	6,2089
435	0,0044	0,0045	0,0046	0,0046	0,0047	0,0046	±0,0002	5,1437
465	0,0044	0,0045	0,0046	0,0046	0,0047	0,0046	±0,0002	5,1437
480	0,0044	0,0045	0,0046	0,0047	0,0047	0,0046	±0,0003	5,8564
510	0,0044	0,0046	0,0046	0,0047	0,0047	0,0046	±0,0003	5,4772

Таблица 21(в). Серия опытов для оценки высвобождения фульвовой кислоты из базового состава

Время отбора пробы (t, мин)	Содержание ФК, высвободившееся, из образца с базовым составом (x_i , г/мл)					Средние значения (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)	Относительная погрешность среднего (ϵ_{cp} , %)
	1	2	3	4	5			
15	0,0026	0,0027	0,0028	0,0029	0,0030	0,0028	±0,0003	11,6168
30	0,0028	0,0029	0,0029	0,0030	0,0030	0,0029	±0,0002	5,8944
60	0,0030	0,0031	0,0031	0,0032	0,0032	0,0031	±0,0002	5,5165
90	0,0032	0,0034	0,0035	0,0036	0,0036	0,0035	±0,0003	9,9489
120	0,0038	0,0039	0,0040	0,0041	0,0041	0,0040	±0,0003	6,7393
180	0,0042	0,0043	0,0044	0,0045	0,0045	0,0044	±0,0003	6,1238
240	0,0044	0,0045	0,0045	0,0046	0,0046	0,0045	±0,0002	3,8079
270	0,0047	0,0048	0,0048	0,0049	0,0050	0,0048	±0,0002	4,8462
330	0,0047	0,0048	0,0048	0,0049	0,0050	0,0048	±0,0002	4,8462
390	0,0047	0,0048	0,0048	0,0049	0,0050	0,0048	±0,0002	4,8462

Таблица 21(г). Серия опытов для оценки высвобождения фульвовой кислоты из состава с ДМСО

Время отбора пробы (t, мин)	Содержание ФК, высвободившееся, из образца с ДМСО (x_i , г/мл)					Средние значения (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)	Относительная погрешность среднего (ϵ_{cp} , %)
	1	2	3	4	5			
15	0,0037	0,0038	0,0038	0,0039	0,0040	0,0038	±0,0002	6,1082
30	0,0054	0,0054	0,0055	0,0055	0,0056	0,0055	±0,0002	3,1408
60	0,0057	0,0058	0,0058	0,0059	0,0060	0,0058	±0,0002	4,0164
90	0,0060	0,0061	0,0062	0,0063	0,0063	0,0062	±0,0003	4,3402
120	0,0064	0,0064	0,0065	0,0066	0,0066	0,0065	±0,0002	3,1649
150	0,0065	0,0065	0,0066	0,0066	0,0067	0,0066	±0,0002	2,6157

Продолжение таблицы 21(з)

180	0,0066	0,0066	0,0067	0,0067	0,0068	0,0067	±0,0002	2,5766
240	0,0066	0,0066	0,0067	0,0067	0,0068	0,0067	±0,0002	2,5766
270	0,0066	0,0066	0,0067	0,0067	0,0068	0,0067	±0,0002	2,5766

Проверка однородности выборок ($n=5$) при расчёте значений контрольного критерия идентификации грубых ошибок Q , исходя из величины размаха варьирования $R=x_{\max} - x_{\min}$, показала, что выборки являются однородными при доверительной вероятности $P=99\%$, то есть при $Q(5, 99\%)$ вероятность грубой ошибки исключается. Расчёты осуществлялись, согласно формулам:

$$R = |x_1 - x_n|;$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R};$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R};$$

Расчёты дисперсии S^2 , стандартного отклонения S , стандартного отклонения среднего S_{cp} при $n=5$, $f = n - 1 = 5 - 1 = 4$ осуществлялись по формулам:

$$x_{cp} = \frac{\sum_1^n x_i}{n};$$

$$d_i = |x_i - x_{cp}|;$$

$$S^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{f} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \cdot x_{cp}^2}{f};$$

$$S = \sqrt{S^2};$$

$$S_{cp} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Полученные результаты представили в таблице 22 (а, б, в, г).

Таблица 22(а). Значения основных статистических характеристик для состава с Kolliphor p237

Время отбора пробы (t , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	S^2	S	S_{cp}
15	0,0012	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
30	0,0012	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
60	0,0031	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
90	0,0036	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
120	0,0039	$1,8 \cdot 10^{-8}$	0,000134	$6,0000 \cdot 10^{-5}$
150	0,0048	$4,3 \cdot 10^{-8}$	0,000207	$9,2736 \cdot 10^{-5}$
180	0,0055	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
240	0,0058	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
300	0,0061	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
360	0,0069	$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,000158	$7,0711 \cdot 10^{-5}$
420	0,0070	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
435	0,0080	$3,7 \cdot 10^{-8}$	0,000192	$8,6023 \cdot 10^{-5}$
450	0,0080	$1,2 \cdot 10^{-8}$	0,000110	$4,8990 \cdot 10^{-5}$
465	0,0080	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
480	0,0080	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$

Таблица 22(б). Значения основных статистических характеристик для состава с Kolliphor p338

Время отбора пробы (t , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	S^2	S	S_{cp}
15	0,0012	$8,0 \cdot 10^{-9}$	0,000089	$4,0000 \cdot 10^{-5}$
30	0,0013	$2,7 \cdot 10^{-8}$	0,000164	$7,3485 \cdot 10^{-5}$
60	0,0022	$2,2 \cdot 10^{-8}$	0,000148	$6,6332 \cdot 10^{-5}$
90	0,0023	$3,7 \cdot 10^{-8}$	0,000192	$8,6023 \cdot 10^{-5}$
120	0,0024	$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,000158	$7,0711 \cdot 10^{-5}$
180	0,0029	$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,000158	$7,0711 \cdot 10^{-5}$
240	0,0032	$4,3 \cdot 10^{-8}$	0,000207	$9,2736 \cdot 10^{-5}$
300	0,0039	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
360	0,0042	$5,0 \cdot 10^{-8}$	0,000224	$1,0000 \cdot 10^{-5}$
390	0,0043	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
435	0,0046	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
465	0,0046	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
480	0,0046	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
510	0,0046	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$

Таблица 22(в). Значения основных статистических характеристик для базового состава

Время отбора пробы (<i>t</i> , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	S^2	S	S_{cp}
15	0,0028	$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,000158	$7,0711 \cdot 10^{-5}$
30	0,0029	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
60	0,0031	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
90	0,0035	$2,8 \cdot 10^{-8}$	0,000167	$7,4833 \cdot 10^{-5}$
120	0,0040	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
180	0,0044	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
240	0,0045	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
270	0,0048	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
330	0,0048	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
390	0,0048	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$

Таблица 22(г). Значения основных статистических характеристик для состава с ДМСО

Время отбора пробы (<i>t</i> , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	S^2	S	S_{cp}
15	0,0038	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
30	0,0055	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
60	0,0058	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
90	0,0062	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
120	0,0065	$1,0 \cdot 10^{-8}$	0,000100	$4,4721 \cdot 10^{-5}$
150	0,0066	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
180	0,0067	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
240	0,0067	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
270	0,0067	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$

Величина доверительного интервала $x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$ с заданной доверительной вероятностью $P=99\%$ должна выполнять условия:

$$(x_{cp} - \Delta x_{cp}) \leq \mu \leq (x_{cp} + \Delta x_{cp})$$

Расчёт граничных значений доверительного интервала провели по критерию Стьюдента. Доверительные интервалы результата отдельного определения и среднего результата при $P = 99\%$ получили согласно:

$$(x_i \pm \Delta x) = x_i \pm t(P, f) \cdot S = x_i \pm t(99, 4) \cdot S;$$

$$(x_{cp} \pm \Delta x_{cp}) = x_{cp} \pm \frac{t(P, f) \cdot S}{\sqrt{n}} = x_{cp} \pm \frac{t(99, 4) \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Полученные результаты представили в таблице 23 (а, б, в, г).

Таблица 23(а). Доверительные интервалы для состава с Kolliphor p237

Время отбора пробы (t, мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал отдельного измерения ($x_i \pm \Delta x$)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
15	0,0012	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
30	0,0012	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
60	0,0031	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
90	0,0036	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
120	0,0039	$\pm 0,00061715$	$\pm 0,0003$
150	0,0048	$\pm 0,00095388$	$\pm 0,0004$
180	0,0055	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
240	0,0058	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
300	0,0061	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
360	0,0069	$\pm 0,00072732$	$\pm 0,0003$
420	0,0070	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
435	0,0080	$\pm 0,00088483$	$\pm 0,0004$
450	0,0080	$\pm 0,00050390$	$\pm 0,0002$
465	0,0080	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
480	0,0080	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$

Таблица 23(б). Доверительные интервалы для состава с Kolliphor p338

Время отбора пробы (t, мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал отдельного измерения ($x_i \pm \Delta x$)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
15	0,0012	$\pm 0,00041144$	$\pm 0,0002$
30	0,0013	$\pm 0,00075586$	$\pm 0,0003$
60	0,0022	$\pm 0,00068229$	$\pm 0,0003$
90	0,0023	$\pm 0,00088483$	$\pm 0,0004$
120	0,0024	$\pm 0,00072732$	$\pm 0,0003$

Продолжение таблицы 23(б)

180	0,0029	$\pm 0,00072732$	$\pm 0,0003$
240	0,0032	$\pm 0,00095388$	$\pm 0,0004$
300	0,0039	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
360	0,0042	$\pm 0,00102859$	$\pm 0,0005$
390	0,0043	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
435	0,0046	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
465	0,0046	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
480	0,0046	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
510	0,0046	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
600	0,0040	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$

Таблица 23(в). Доверительные интервалы для базового состава

Время отбора пробы (t , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал отдельного измерения ($x_i \pm \Delta x$)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
15	0,0028	$\pm 0,00072732$	$\pm 0,0003$
30	0,0029	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
60	0,0031	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
90	0,0035	$\pm 0,00076973$	$\pm 0,0003$
120	0,0040	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
180	0,0044	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
240	0,0045	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
270	0,0048	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
330	0,0048	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
390	0,0048	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$

Таблица 23(г). Доверительные интервалы для состава с ДМСО

Время отбора пробы (t , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал отдельного измерения ($x_i \pm \Delta x$)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
15	0,0038	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
30	0,0055	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
60	0,0058	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
90	0,0062	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
120	0,0065	$\pm 0,00046000$	$\pm 0,0002$
150	0,0066	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
180	0,0067	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
240	0,0067	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
270	0,0067	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$

Обозначая конечное содержание фульвово́й кислоты, высвобожденной из лекарственной формы за время эксперимента, через μ , можно считать, что с 99 % доверительной вероятностью справедливы следующие неравенства для состава с Kolliphor p237:

$$\mu - 0.00052448 \leq x_i \leq \mu + 0.00052448$$

$$x_i - 0.00052448 \leq \mu \leq x_i + 0.00052448 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0002 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0002; x_{cp} - 0.0002 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0002 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

для состава с Kolliphor p338:

$$\mu - 0.00056338 \leq x_i \leq \mu + 0.00056338$$

$$x_i - 0.00056338 \leq \mu \leq x_i + 0.00056338 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0003 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0003; x_{cp} - 0.0003 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0003 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

для состава с сорбитолом:

$$\mu - 0.00052448 \leq x_i \leq \mu + 0.00052448$$

$$x_i - 0.00052448 \leq \mu \leq x_i + 0.00052448 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0002 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0002; x_{cp} - 0.0002 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0002 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

для базового состава:

$$\mu - 0.00052448 \leq x_i \leq \mu + 0.00052448$$

$$x_i - 0.00052448 \leq \mu \leq x_i + 0.00052448 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0002 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0002; x_{cp} - 0.0002 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0002 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

для состава с ДМСО:

$$\mu - 0.00038486 \leq x_i \leq \mu + 0.00038486$$

$$x_i - 0.00038486 \leq \mu \leq x_i + 0.00038486 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0002 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0002; x_{cp} - 0.0002 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0002 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Определение концентрации, высвобожденной фульвовой кислоты

Таблица 24. Серия градуировочных растворов для количественного определения фульвово́й кислоты

Концентрация, $\cdot 10^{-5}$ г/мл	Интенсивность флуоресценции, усл.ед.			Средние значения, усл.ед.
0,025	0,017	0,018	0,018	0,018
0,05	0,034	0,035	0,036	0,035
0,1	0,079	0,081	0,082	0,081
0,2	0,115	0,115	0,116	0,115
0,3	0,200	0,200	0,201	0,200
0,4	0,265	0,265	0,265	0,265
0,5	0,325	0,326	0,326	0,326
0,6	0,407	0,407	0,408	0,407
0,7	0,499	0,501	0,502	0,501
0,8	0,512	0,513	0,514	0,513
0,9	0,609	0,611	0,612	0,611
1,0	0,671	0,672	0,673	0,672
1,4	0,898	0,899	0,900	0,899
1,7	1,122	1,123	1,124	1,123
2,0	1,274	1,275	1,276	1,275

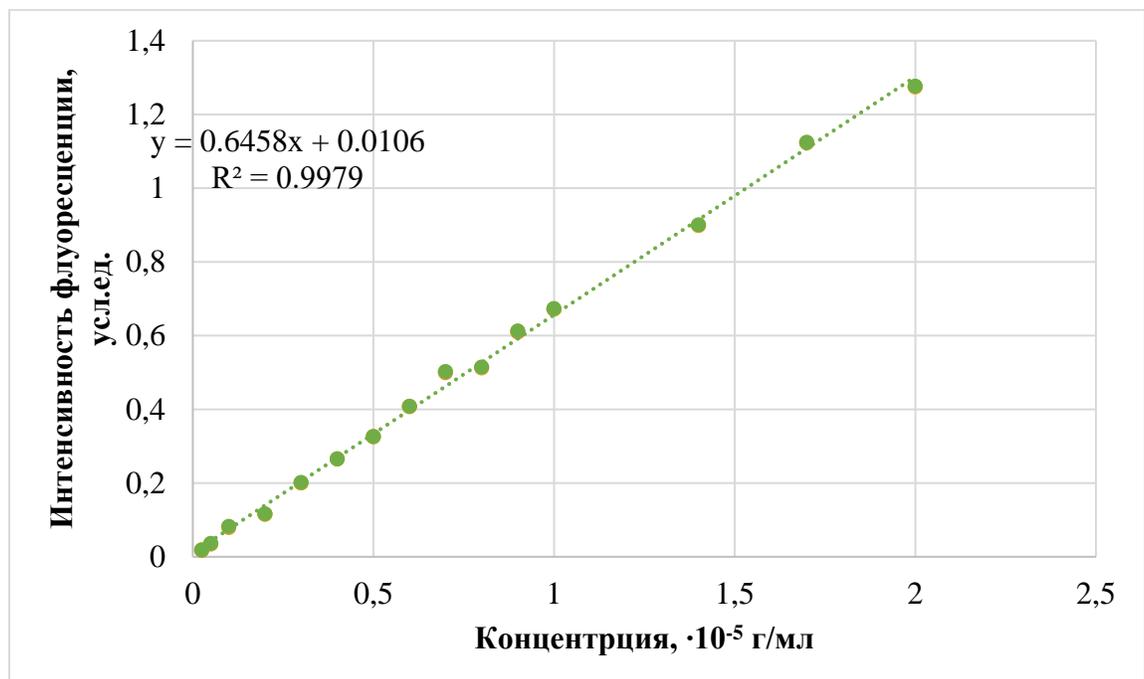


Рисунок 27. Градуировочная кривая для количественного определения фульвово́й кислоты

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

**Статистическая обработка результатов проницаемости согласно
ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического
эксперимента**

Таблица 25(а). Серия опытов для оценки проницаемости фульвовой кислоты из состава с Kolliphor p237

Время отбора пробы (t, мин)	Содержание ФК, высвободившееся, из образца с Kolliphor p237 (x_i , г/мл)					Средние значения (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)	Относительная погрешность среднего (ϵ_{cp} , %)
	1	2	3	4	5			
30	0,0047	0,0047	0,0048	0,0048	0,0049	0,0048	$\pm 0,0002$	3,6008
60	0,0090	0,0090	0,0091	0,0091	0,0092	0,0091	$\pm 0,0002$	1,8956
90	0,0100	0,0102	0,0104	0,0105	0,0106	0,0103	$\pm 0,0005$	4,7914
120	0,0106	0,0108	0,0108	0,0109	0,0110	0,0108	$\pm 0,0003$	2,8201
150	0,0111	0,0112	0,0112	0,0113	0,0113	0,0112	$\pm 0,0002$	1,5340
180	0,0114	0,0114	0,0115	0,0115	0,0116	0,0115	$\pm 0,0002$	1,4993
210	0,0116	0,0116	0,0117	0,0117	0,0119	0,0117	$\pm 0,0003$	2,1534
240	0,0117	0,0117	0,0118	0,0118	0,0119	0,0118	$\pm 0,0002$	1,4611
270	0,0119	0,0120	0,0121	0,0122	0,0124	0,0121	$\pm 0,0004$	3,2649
300	0,0120	0,0121	0,0122	0,0122	0,0126	0,0122	$\pm 0,0005$	3,8389
330	0,0121	0,0121	0,0122	0,0123	0,0126	0,0123	$\pm 0,0004$	3,4795
360	0,0124	0,0125	0,0126	0,0126	0,0127	0,0126	$\pm 0,0002$	1,8675
390	0,0124	0,0125	0,0126	0,0126	0,0127	0,0126	$\pm 0,0002$	1,8675
420	0,0124	0,0125	0,0126	0,0126	0,0127	0,0126	$\pm 0,0002$	1,8675

Таблица 25(б). Серия опытов для оценки проницаемости фульвовой кислоты из базового состава

Время отбора пробы (t, мин)	Содержание ФК, высвободившееся, из образца с базовым составом (x_i , г/мл)					Средние значения (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)	Относительная погрешность среднего (ϵ_{cp} , %)
	1	2	3	4	5			
30	0,0069	0,0070	0,0071	0,0072	0,0073	0,0071	$\pm 0,0003$	4,5813
60	0,0071	0,0071	0,0072	0,0073	0,0074	0,0072	$\pm 0,0003$	3,7150
90	0,0071	0,0073	0,0073	0,0074	0,0075	0,0073	$\pm 0,0003$	4,1684
120	0,0073	0,0074	0,0074	0,0075	0,0076	0,0074	$\pm 0,0002$	3,1526
150	0,0074	0,0074	0,0075	0,0075	0,0077	0,0075	$\pm 0,0003$	3,3594
180	0,0075	0,0076	0,0077	0,0077	0,0079	0,0077	$\pm 0,0003$	3,9730
210	0,0076	0,0077	0,0077	0,0077	0,0079	0,0077	$\pm 0,0002$	2,9191
240	0,0077	0,0078	0,0078	0,0078	0,0080	0,0078	$\pm 0,0002$	2,8818
270	0,0078	0,0078	0,0079	0,0079	0,0080	0,0079	$\pm 0,0002$	2,1842
300	0,0078	0,0078	0,0079	0,0079	0,0081	0,0079	$\pm 0,0003$	3,1893

Продолжение таблицы 25(б)

330	0,0079	0,0079	0,0080	0,0080	0,0082	0,0080	±0,0003	3,1494
360	0,0079	0,0079	0,0080	0,0080	0,0082	0,0080	±0,0003	3,1494
390	0,0079	0,0079	0,0080	0,0080	0,0082	0,0080	±0,0003	3,1494
420	0,0079	0,0079	0,0080	0,0080	0,0082	0,0080	±0,0003	3,1494

Проверка однородности выборок ($n=5$) при расчёте значений контрольного критерия идентификации грубых ошибок Q , исходя из величины размаха варьирования $R=x_{max} - x_{min}$, показала, что выборки являются однородными при доверительной вероятности $P=99\%$, то есть при $Q(5, 99\%)$ вероятность грубой ошибки исключается. Расчёты осуществлялись, согласно формулам:

$$R = |x_1 - x_n|;$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R};$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R};$$

Расчёты дисперсии S^2 , стандартного отклонения S , стандартного отклонения среднего S_{cp} при $n=5$, $f = n - 1 = 5 - 1 = 4$ осуществлялись по формулам:

$$x_{cp} = \frac{\sum_1^n x_i}{n};$$

$$d_i = |x_i - x_{cp}|;$$

$$S^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{f} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \cdot x_{cp}^2}{f};$$

$$S = \sqrt{S^2};$$

$$S_{cp} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Полученные результаты представили в таблице 26 (а, б).

Таблица 26(а). Значения основных статистических характеристик для состава с Kolliphor p237

Время отбора пробы (t , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	S^2	S	S_{cp}
30	0,0048	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
60	0,0091	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
90	0,0103	$5,8 \cdot 10^{-8}$	0,000241	$1,0770 \cdot 10^{-4}$
120	0,0108	$2,2 \cdot 10^{-8}$	0,000148	$6,6332 \cdot 10^{-5}$
150	0,0112	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
180	0,0115	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
210	0,0117	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$
240	0,0118	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
270	0,0121	$3,7 \cdot 10^{-8}$	0,000192	$8,6023 \cdot 10^{-5}$
300	0,0122	$5,2 \cdot 10^{-8}$	0,000228	$1,0198 \cdot 10^{-4}$
330	0,0123	$4,3 \cdot 10^{-8}$	0,000207	$9,2736 \cdot 10^{-5}$
360	0,0126	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
390	0,0126	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
420	0,0126	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$

Таблица 26(б). Значения основных статистических характеристик для базового состава

Время отбора пробы (t , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	S^2	S	S_{cp}
30	0,0071	$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,000158	$7,0711 \cdot 10^{-5}$
60	0,0072	$1,7 \cdot 10^{-8}$	0,000130	$5,8310 \cdot 10^{-5}$
90	0,0073	$2,2 \cdot 10^{-8}$	0,000148	$6,6332 \cdot 10^{-5}$
120	0,0074	$1,3 \cdot 10^{-8}$	0,000114	$5,0990 \cdot 10^{-5}$
150	0,0075	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$
180	0,0077	$2,2 \cdot 10^{-8}$	0,000148	$6,6332 \cdot 10^{-5}$
210	0,0077	$1,2 \cdot 10^{-8}$	0,000110	$4,8990 \cdot 10^{-5}$
240	0,0078	$1,2 \cdot 10^{-8}$	0,000110	$4,8990 \cdot 10^{-5}$
270	0,0079	$7,0 \cdot 10^{-9}$	0,000084	$3,7417 \cdot 10^{-5}$
300	0,0079	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$
330	0,0080	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$
360	0,0080	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$
390	0,0080	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$
420	0,0080	$1,5 \cdot 10^{-8}$	0,000122	$5,4772 \cdot 10^{-5}$

Величина доверительного интервала $x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$ с заданной доверительной вероятностью $P=99\%$ должна выполнять условия:

$$(x_{cp} - \Delta x_{cp}) \leq \mu \leq (x_{cp} + \Delta x_{cp})$$

Расчёт граничных значений доверительного интервала провели по критерию Стьюдента. Доверительные интервалы результата отдельного определения и среднего результата при $P = 99\%$ получили согласно:

$$(x_i \pm \Delta x) = x_i \pm t(P, f) \cdot S = x_i \pm t(99, 4) \cdot S;$$

$$(x_{cp} \pm \Delta x_{cp}) = x_{cp} \pm \frac{t(P, f) \cdot S}{\sqrt{n}} = x_{cp} \pm \frac{t(99, 4) \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Полученные результаты представили в таблице 27 (а, б).

Таблица 27(а). Доверительные интервалы для состава с Kolliphor p237

Время отбора пробы (t, мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал отдельного измерения ($x_i \pm \Delta x$)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
30	0,0048	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
60	0,0091	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
90	0,0103	$\pm 0,00110783$	$\pm 0,0005$
120	0,0108	$\pm 0,00068229$	$\pm 0,0003$
150	0,0112	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
180	0,0115	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
210	0,0117	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
240	0,0118	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
270	0,0121	$\pm 0,00088483$	$\pm 0,0004$
300	0,0122	$\pm 0,00104896$	$\pm 0,0005$
330	0,0123	$\pm 0,00095388$	$\pm 0,0004$
360	0,0126	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
390	0,0126	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
420	0,0126	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$

Таблица 27(б). Доверительные интервалы для базового состава

Время отбора пробы (<i>t</i> , мин)	Средние значения концентраций (x_{cp} , г/мл)	Доверительный интервал отдельного измерения ($x_i \pm \Delta x$)	Доверительный интервал среднего ($x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$)
30	0,0071	$\pm 0,00072732$	$\pm 0,0003$
60	0,0072	$\pm 0,00059977$	$\pm 0,0003$
90	0,0073	$\pm 0,00068229$	$\pm 0,0003$
120	0,0074	$\pm 0,00052448$	$\pm 0,0002$
150	0,0075	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
180	0,0077	$\pm 0,00068229$	$\pm 0,0003$
210	0,0077	$\pm 0,00050390$	$\pm 0,0002$
240	0,0078	$\pm 0,00050390$	$\pm 0,0002$
270	0,0079	$\pm 0,00038486$	$\pm 0,0002$
300	0,0079	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
330	0,0080	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
360	0,0080	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
390	0,0080	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$
420	0,0080	$\pm 0,00056338$	$\pm 0,0003$

Обозначая конечное содержание фульвовой кислоты, высвобожденной из лекарственной формы за время эксперимента, через μ , можно считать, что с 99 % доверительной вероятностью справедливы следующие неравенства для состава с Kolliphor p237:

$$\mu - 0.00038486 \leq x_i \leq \mu + 0.00038486$$

$$x_i - 0.00038486 \leq \mu \leq x_i + 0.00038486 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0002 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0002; x_{cp} - 0.0002 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0002 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

для базового состава:

$$\mu - 0.00072732 \leq x_i \leq \mu + 0.00072732$$

$$x_i - 0.00072732 \leq \mu \leq x_i + 0.00072732 \text{ (при любом значении } i \text{)}$$

$$\mu - 0.0003 \leq x_{cp} \leq \mu + 0.0003; x_{cp} - 0.0003 \leq \mu \leq x_{cp} + 0.0003 \text{ (при } n=5 \text{)}$$

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

**Определение концентрации, высвобожденной фульвовой кислоты в
исследовании проницаемости**

Таблица 28. Определение концентрации, высвобожденной фульвовой кислоты в тесте проницаемость

Концентрация, $\cdot 10^{-6}$ г/мл	Интенсивность флуоресценции, усл.ед.			Средние значения, усл.ед.
0,092	0,011	0,012	0,013	0,012
0,185	0,017	0,018	0,018	0,018
0,370	0,037	0,037	0,038	0,037
0,740	0,060	0,061	0,062	0,061
1,110	0,070	0,071	0,071	0,071
1,480	0,098	0,099	0,100	0,099
1,850	0,127	0,128	0,129	0,128
2,220	0,157	0,158	0,159	0,158
2,590	0,180	0,181	0,182	0,181
2,960	0,210	0,211	0,211	0,211
3,330	0,233	0,234	0,235	0,234
3,70	0,260	0,261	0,262	0,261

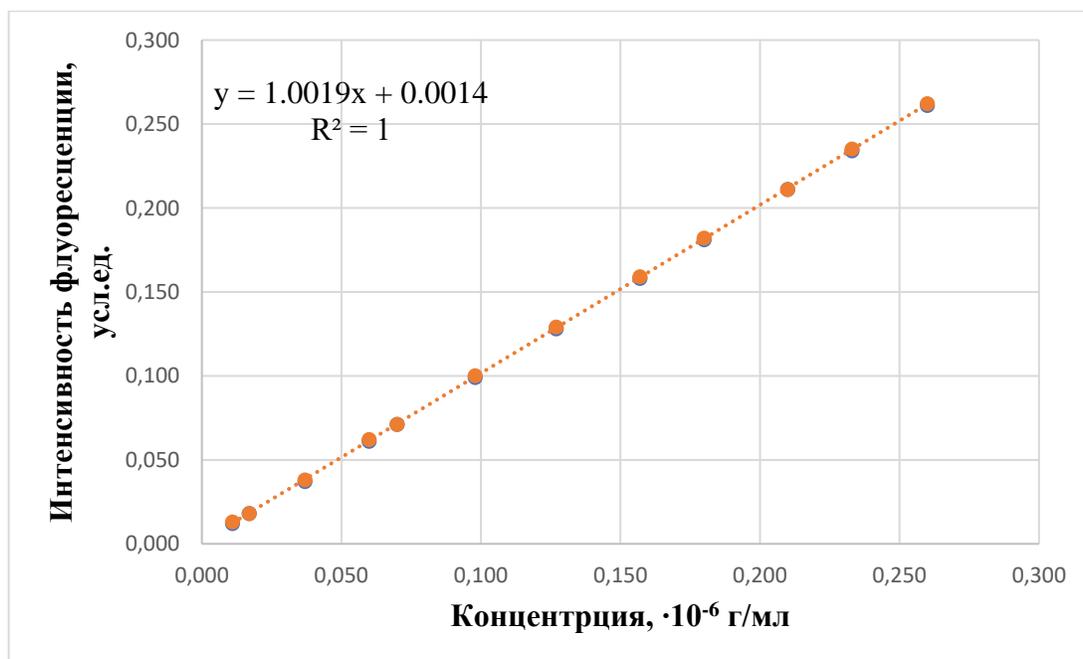


Рисунок 28. Градуировочная кривая для количественного определения фульвовой кислоты в тесте проницаемость

ПРИЛОЖЕНИЕ 9

**Выписка из протокола заседания Комитета по Этике ФГБОУ ВО
«ПИМУ» Минздрава России**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Приволжский исследовательский медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 603155, г. Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, 18/1

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 02

Заседания Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России

от 17.02.2023 года

Присутствовали:

Председатель ЛЭК: А.В. Качко

Заместитель Председателя ЛЭК: В.И. Загреков

Секретарь: к.м.н. Г.Е. Шейко

Члены комитета по этике: к.м.н. доц. В.А. Балчугов, к.м.н. О.А. Шапкина, Е.В.

Донченко, к.м.н. О.П. Живцов

Присутствовали: А.В. Кадомцева, К.А. Ачкасова, С.А. Родимова, А.П. Сайфуллин

Повестка

К рассмотрению документы по диссертационному исследованию «Разработка фармацевтической композиции на основе производных гуминовых кислот» по специальности «Промышленная фармация и технология получения лекарств» 3.4.1.

Исполнитель диссертационного исследования: аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Коннова Мария Алексеевна.

Научный руководитель: к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Волков Александр Александрович.

Сроки выполнения: работа запланирована в 2020 г. и выполнена на 60%.

Представленные документы:

1. Протокол исследования.
2. Аннотация диссертационной/научной работы.
3. Аннотация на используемые в исследовании лекарственные препараты.
4. Профессиональная автобиография исследователя.
5. Профессиональные автобиографии научного руководителя.
6. Копия приказа об утверждении тем диссертационных работ.
7. Выписка из протокола заседания проблемной комиссии.
8. Заключение независимого эксперта: к.ф.н., доцента кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Малыгиной Дарины Сергеевны.
9. Соглашение о конфиденциальности эксперта.

СЛУШАЛИ: секретаря ЛЭК к.м.н. Г.Е. Шейко, который проинформировал членов комитета о диссертационном исследовании.

Цель исследования: разработка фармацевтических композиций на основе производных гуминовых кислот для профилактики и комплексной терапии воспалительных процессов в суставах.

Задачи исследования:

1. Поиск эффективных методов выделения и очистки производных гуминовых кислот.

2. Разработка методик анализа гуминовых производных.
3. Разработка оптимальной технологии введения гуминовых производных в фармацевтическую композицию.
4. Исследование биологической активности лекарственной системы *invitro* и *invivo*.
5. Предложить параметры стандартизации гуминовых производных и их сырьевого источника, подготовить проекты нормативной документации.

Исследование экспериментальное и включает: получение гуминовых производных (фульвовой кислоты), введение фульвовой кислоты в фармацевтическую композицию и исследование на животных.

Количество животных (белые крысы, порода - "Wistar", самцы), используемое в исследовании, минимально и достаточно для полной и надежной регистрации изучаемых эффектов и статистической обработки данных (n=30, возраст 2-3 месяца).

Животным под комбинированным наркозом проводится эпиляция области колена и подкожно в область опытного коленного сустава вводится агент, индуцирующий развитие артрита. Наркоз – Золетил (60 мкг/кг), Ксила (6 мг/кг). № регистрационного удостоверения: Золетил: 250-3-36.16-1793№ПВИ-3-1.9/01 425, Ксила: ЗК-ВП-4-1744-11.

Через 14 дней животным с клиническими признаками артрита наружно в области опытного коленного сустава наносят исследуемую композицию (трансдермальную терапевтическую систему).

Трансдермальная терапевтическая система- лекарственная форма для наружного применения, предназначенная для контролируемой доставки лекарственного вещества (веществ) в системный кровоток путём пассивной диффузии через неповрежденную кожу (ОФС.1.4.1.0016.15).

Критерии включения в экспериментальное исследование: масса тела в начале исследования – 200 г и более; возраст на начало исследования – 2-3 месяца.

Критерии исключения из экспериментального исследования: больные животные, самки, животные массой менее 200 г.

Диссертационное исследование аспиранта кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Конновой Марии Алексеевны на тему «Разработка фармацевтической композиции на основе производных гуминовых кислот» одобрено на заседании подкомиссии по рассмотрению диссертационных работ Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, выписка из протокола заседания 1/Д-2023 от 23.01.2023 года.

ПОСТАНОВИЛИ: одобрить диссертационное исследование «Разработка фармацевтической композиции на основе производных гуминовых кислот» аспиранта кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Конновой Марии Алексеевны.

Председатель ЛЭК

Секретарь ЛЭК



А.В. Качко

Г.Е. Шейко

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования**

**«Приволжский исследовательский медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Адрес: 603155, г. Нижний Новгород, Верхневолжская набережная, 18/1

ПРОТОКОЛ № 06

Заседания Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
от 07.06.2024 года

Присутствовали:

Председатель ЛЭК: А.В. Качко

Заместитель Председателя ЛЭК: В.И. Загреков

Секретарь: Г.Е. Шейко

Члены комитета по этике: Е.А. Галова, О.А. Шапкина, Е.В. Донченко, В.А. Балчугов, К.Е. Новгородский

Приглашенные: Д.Я. Алейник, Д.Д. Линькова, А.Н. Крылова, М.А. Басарукина, О.А. Новосадову, К.С. Першина, Д.И. Сундуков, А.Ю. Чиркова, Г.А. Савичев, Д.В. Южакова

Повестка:

К рассмотрению документы по диссертационной работе на тему «Разработка фармацевтической композиции на основе производных гуминовых кислот» по специальности 3.4.1. промышленная фармация и технология получения лекарств, которые подаются в связи с изменением темы диссертационной работы и специальности, по которой выполняются диссертационная работа.

Исполнитель диссертационного исследования: аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Коннова Мария Алексеевна

Научный руководитель: к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Волков Александр Александрович

Представленные документы:

1. Протокол диссертационного исследования с участием животных (самцы крыс) в качестве объекта исследования
(Протокол_исследования_Коннова_1,79МБ_05.06.2024)
2. Выписка из протокола №2 Заседания Комитета по Этике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России от 17.02.2023 года
(Выписка_ЛЭК_Коннова_5,58_МБ_06.06.2024)
3. Выписка из протокола №7 (дистанционного) заседания Ученого совета ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России от 27.09.2020 года
(Выписка_Ученый_совет_№7_Коннова_116КБ_05.06.2024)
4. Выписка из протокола №13 заседания Ученого совета ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России от 21.12.2023 года
(Выписка_Ученый_совет_№7_Коннова_140КБ_05.06.2024)

СЛУШАЛИ: секретаря ЛЭК Г.Е. Шейко, который проинформировал членов комитета о представленных документах.

Работа запланирована в 2020 году и выполнена на 100%.

Новое название диссертационной работы - «Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвовой кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области» по специальности 3.4.2. фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Изменение темы и специальности диссертационной работы проведено в связи с рекомендацией Диссертационного Совета ПДС 0300.021.

ПОСТАНОВИЛИ: одобрить изменение темы и специальности диссертационного исследования «Разработка фармацевтической композиции на основе производных гуминовых кислот» по специальности 3.4.1. промышленная фармация и технология получения лекарств на «Выделение, исследование и разработка подходов стандартизации фульвовой кислоты, извлечённой из торфа Нижегородской области» по специальности 3.4.2. фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Председатель ЛЭК

Секретарь ЛЭК



А.В. Качко

Г.Е. Шейко

ПРИЛОЖЕНИЕ 10

**Поиск оптимального состава для трансдермальных пластырей с
фульвово́й кислотой**

Таблица 29. Первоначальные составы эмульсионных основ

Remulen TR1 – 0,2 ПГ – 5,0 Воск эмульсионный – 2,5 Канделильский воск – 0,5 Цетиловый спирт – 1,0 Вода очищенная – 9,8	Remulen TR1 – 0,1 ПВП К25 – 0,1 ПГ-5,0 Воск эмульсионный – 2,5 Канделильский воск – 0,5 Цетиловый спирт – 1,0 Вода очищенная – 9,8	Remulen TR1 – 0,2 ПЭО 400 – 2,5 ПЭО 1500 – 2,5 Воск эмульсионный – 2,5 Канделильский воск – 0,5 Цетиловый спирт – 1,0 Вода очищенная – 9,8
Remulen TR1 – 0,1 ПВП К25 – 0,1 ПЭО 400 – 2,5 ПЭО 1500 – 2,5 Воск эмульсионный – 2,5 Канделильский воск – 0,5 Цетиловый спирт – 1,0 Вода очищенная – 9,8	Remulen TR1 – 0,2 ПГ – 5,0 Воск эмульсионный – 2,5 Воск канделильский – 1,5 Вода очищенная – 9,8	Remulen TR 1 – 0,1 ПВП К25 – 0,1 ПГ – 5,0 Воск эмульсионный – 2,5 Воск канделильский – 1,5 Вода очищенная – 9,8

Таблица 30. Поиск структурирующих агентов и эмульгаторов для основы

ФК – 0,016 Remulen TR1 – 0,1 ПВП К25 – 0,5 ПЭО 400 – 0,1 ПЭО 1500 – 0,2 Воск эмульсионный – 0,1 Глицерин – 1,0 Вода очищенная – 6,0	Основа получается неоднородной. При добавлении раствора ФК+ПВП наблюдается флокуляция/коагуляция пемулена, что является несовместимостью. Также использование в качестве регулятора рН триэтаноламина приводит к взаимодействию аминогруппы вещества с фульвовой кислотой. Принято решение отказаться от Remulen TR1 как загустителя и эмульгатора.
ФК – 0,016 ПВП К-25 – 0,5 ПЭО 400 – 0,2 ПЭО 1500 – 0,2 Лецитин – 0,14 Глицерин – 1,46 Воск эмульсионный – 0,1 Вода очищенная – 3,0	Раствор для приготовления основы получается неоднородным на стадии введения лецитина. От лецитина в качестве эмульгатора принято решение отказаться.
ФК – 0,016 ПВП К-25 – 0,5 ПЭО 400 – 0,1 ПЭО 1500 – 0,2 Твин 80 – 0,1 Глицерин – 1,0 Воск эмульсионный – 0,1 Вода очищенная – 3,0	Плѐнка получается очень липкой из-за взаимодействия ПВП К25 и ПЭО 400. Не просыхает должным образом ввиду большого количества пластификатора, абсорбирующего высокое количество влаги из воздуха (необходимо уменьшить количество пластификатора).

Продолжение таблицы 30

ФК – 0,016 ПВП К-25 – 0,5 ПЭО 400 – 0,1 ПЭО 1500 – 0,1 Твин 80 – 0,1 Глицерин – 0,1 Воск эмульсионный – 0,1 Вода очищенная – 3,0	Плёнка получается очень липкой и очень тонкой. Не держит форму, рвётся. Принято решение ввести дополнительный полимер как структурирующий агент.
ФК – 0,016 ПВП К-25 – 0,5 ПЭО 1500 – 0,1 Твин 80 – 0,1 Глицерин – 0,1 Воск эмульсионный – 0,1 Вода очищенная – 3,0	Аналогична предыдущему составу.

Таблица 31. Использование ксантана в качестве структурирующего агента

ФК – 0,016 Ксантан – 0,1 Глицерин – 0,5 ПВП К25 – 0,5 ПЭО 400 – 0,02 ПЭО 1500 – 0,2 Твин 80 – 0,14 Воск эмульсионный – 0,1 Вода – 7,0	Плёнка получается очень липкой в результате взаимодействия ПВП К25 и ПЭО 400. Пластичная и плотная. Не рвётся. Излишней влаги на поверхности плёнки не образуется. Однако наблюдается высаливание фульвово́й кислоты на поверхность плёнки. Предположительно, высаливание ФК происходит из-за ПВП К25, повышающего жёсткость системы. Принято решение использовать ПВП с меньшей молекулярной массой.
ФК – 0,016 Ксантан – 0,1 Глицерин – 0,5 ПВП К17 – 0,5 ПЭО 400 – 0,02 ПЭО 1500 – 0,2 Твин 80 – 0,14 Воск эмульсионный – 0,1 Вода – 7,0	Образуется липкая плёнка в результате взаимодействия ПВП К17 и ПЭО 400. Данное свойство позволяет избежать введения дополнительных адгезивов. Плёнка пластичная и плотная. Высаливания ФК не происходит. Принято решение использовать эту плёнку в качестве базового состава.

ПРИЛОЖЕНИЕ 11

**Проект спецификации «Фульвовая кислота низинного торфа
Нижегородской области Тоншаевского района, 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}C ЯМР-спектры исследуемой субстанции должны соответствовать ^{13}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 ($\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ нм}$) в одномерных 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
	рН	Водный 0,01% раствор исследуемой субстанции должен иметь рН не более 3
Посторонние примеси	ОФС.1.2.3.0011.15	Суммарное содержание азота не более 0,17%.
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"> - Общее число аэробных микроорганизмов – не более КОЕ в 1 г (мл) - Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более КОЕ в 1 г (мл) - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г (мл) - Отсутствие бактерий рода <i>Salmonella</i> в 25 г (мл) - Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г (мл) - Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г (мл) - Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более КОЕ в 1 г (мл)
Количественное определение	Спектрофлуориметрия	от 95 до 105% в пересчете на сухое вещество
Хранение	В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.	
Срок годности	3 года	