

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

---

---

Рік заснування – 1993

ВІСНИК  
ФАРМАЦІЇ



NEWS OF  
PHARMACY



ВЕСТНИК  
ФАРМАЦИИ

2014 – №2(78)

Харків  
НФаУ

Редакційна колегія:

В.П.Черних — головний редактор  
О.І.Тихонов — заступник головного редактора

П.О.Безуглий, В.П.Георгієвський, В.А.Георгіянец, І.С.Гриценко,  
Т.А.Грошовий, С.М.Дроговоз, Т.В.Жукова (*відповідальний секретар*),  
І.А.Зупанець, Б.С.Зіменковський, С.М.Коваленко, Н.М.Кононенко,  
О.М.Котенко (*директор видавництва*), З.М.Мнушко, В.Д.Орлов,  
М.Ф.Пасічник, І.М.Перцев, Б.А.Самура, А.М.Сердюк, В.М.Толочко

Редакційна рада:

С.А.Андронаті (Одеса), О.М.Біловол (Київ), Ю.Л.Волянський (Харків),  
G.M.Kitanov (Sofia), О.І.Гризодуб (Харків), О.П.Гудзенко (Луганськ),  
Д.І.Дмитрієвський (Харків), Т.Г.Калинюк (Львів), Ю.М.Краснопольський (Харків),  
В.Й.Кресюн (Одеса), І.А.Мазур (Запоріжжя), В.П.Музиченко (Львів),  
Б.Л.Парновський (Львів), P.Szefer (Gdansk), S.D.Nikolov (Sofia),  
М.М.Тимченко (Харків), Z.Vincze (Budapest), Л.В.Яковлева (Харків),  
Т.Г.Ярних (Харків)

**У черговому випуску журналу представлені оригінальні роботи з технології лікарських препаратів, у тому числі біофармацевтичні дослідження; статті з синтезу, реакційної здатності та аналізу біологічно активних речовин та лікарської рослинної сировини. Розглянуті актуальні питання організації та економіки фармації, висвітлені деякі аспекти експериментальної фармакології.**

**Для науковців, провізорів, лікарів, організаторів системи охорони здоров'я.**

Рекомендовано Вченою радою Національного фармацевтичного університету  
(протокол №10 від 28.05.2014 р.)

Журнал "Вісник фармації" включений до переліку фахових видань України для опублікування результатів дисертаційних робіт з фармацевтичних наук (постанова Президії ВАК України від 16 грудня 2009 р. №1-05/6) та медичних наук (постанова Президії ВАК України від 1 липня 2010 р. №1-05/5).

З 2002 року Chemical Abstracts Service здійснює відбір та розміщення електронних версій рефератів журналу "Вісник фармації" на своїй веб-сторінці: <http://www.cas.org> (код журналу: VFIAA2)



**14 – 16 ЖОВТНЯ 2014 РОКУ** у м. Києві (ВЦ «КиївЕкспоПлаза») відбудеться **V ЮВІЛЕЙНИЙ МІЖНАРОДНИЙ МЕДИЧНИЙ ФОРУМ** – масштабний комплексний захід інноваційного напрямку галузі охорони здоров'я України, який об'єднує науково-практичну програму, школи, виставки та спеціалізовані експозиції і створює міжнародну платформу для обміну досвідом та підвищення кваліфікації фахівців охорони здоров'я.

Організатори Форуму – Національна академія медичних наук України, Національна академія наук України, Компанія LMT. За підтримки Комітету Верховної Ради з питань охорони здоров'я, Міністерства охорони здоров'я України, Державної служби України з лікарських засобів, Державної санітарно-епідеміологічної служби України і при сприянні медичних асоціацій, громадських об'єднань, вищих навчальних медичних закладів України, соціальних фондів.

#### Форум об'єднує:

**III МІЖНАРОДНИЙ МЕДИЧНИЙ КОНГРЕС «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України»**, який внесено до «Реєстру з'їздів, конгресів, симпозіумів і науково-практичних конференцій, що проводяться в 2014 році», затверджено НАМН і МОЗ України.

**MEDICAEXPO** – Міжнародна виставка охорони здоров'я

**PHARMAEXPO** – Міжнародна фармацевтична виставка

**MEDZoom** – зона майстер-класів та презентацій

**InnovationZone** – відкриті презентації інноваційних розробок галузі охорони здоров'я

Традиційно на виставці **PHARMAEXPO** будуть представлені лікарські препарати, парафармацевтична продукція, товари медичного призначення, лікувальна косметика українських та зарубіжних виробників, крім того запланована окрема експозиція комплексних рішень щодо оснащення аптечних закладів та послуг для фармацевтичного ринку, що, безсумнівно, приверне увагу фахівців. Спеціалісти матимуть можливість взяти участь у науково-практичній програмі Форуму, обмінятися досвідом, отримати корисну інформацію, розширити та удосконалити практичні та теоретичні навички, підвищити кваліфікацію. Зокрема для фармакологів, клінічних фармакологів, фармацевтів, розробників та дослідників ЛЗ ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» проводитиме практичний семінар «Проведення доклінічних досліджень». Для представників аптечних закладів, завідувачів аптек, провізорів ТОВ «Агентство Медичного Маркетингу» проводитиме майстер-класи «Як зробити кар'єру. Практичні поради аптечним співробітникам» та багато інших заходів.

Запрошуємо **14-16 жовтня 2014 року** в ВЦ «КиївЕкспоПлаза» (Україна, м. Київ, вул. Салютна, 2-Б) взяти участь у **V ЮВІЛЕЙНОМУ МІЖНАРОДНОМУ МЕДИЧНОМУ ФОРУМІ**  
«Інновації в медицині – здоров'я нації»

#### Додаткова інформація

##### З питань участі у виставках:

Тел.: +380 (44) 526-93-09, 526-92-97

E-mail: med@lmt.kiev.ua, pharm@lmt.kiev.ua

##### З питань участі у Форумі:

Тел.: +380 (44) 526-92-89, 361-07-21

E-mail: marketing@lmt.kiev.ua

[www.medforum.in.ua](http://www.medforum.in.ua)

## ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor T.G. Yarnykh*

UDC 615.453:615.243:638.13

### METHODOLOGY OF CREATING AN ENCAPSULATED DOSAGE FORM WITH BEE PRODUCTS. REPORT II

N.S. Bogdan, O.I. Tikhonov

Bukovina State Medical University  
National University of Pharmacy

*Key words: bee products; granules; capsules; antiulcer effect*

*On the basis of experimental studies the authors have demonstrated that a topical issue of the pharmaceutical science today is development of the rational therapeutic dosage forms based on standardized biologically active substances of bee products that have specific chemical and pharmacological properties for new domestic, natural, highly effective drugs for prevention and treatment of ulcer diseases of the human gastroduodenal area. The pharmaceutical market of drugs with the antiulcer activity of different dosage forms has been analyzed. It has been found that dosage forms produced in a small range are economically and socially efficient for further development of a completely new drug based on bee products. Today science has proven that encapsulated dosage forms are promising. This dosage form is a cost effective, and allows to encapsulate various drugs from substances in the solid state to liquid and pasty ingredients. Research in recent years has confirmed that the choice of a rational dosage form of drugs in combination with excipients provide the optimal pharmacological effect of drugs under development, which production is possible both in industrial and pharmacy conditions.*

The study of natural medicinal resources of our country in order to seek new sources of biologically active substances and creation of national drugs on their basis is a topical issue of pharmacy.

Continuing the experiments with the results presented in the publication [2] the aim of this study was to develop an optimal composition and the rational technology of a solid dosage form – capsules for treating ulcerative gastroduodenal diseases.

As for this problem, bee products (pollen, propolis, honey, bee venom, royal jelly, bee bread) are of particular interest as sources of the raw material. Volumes of their procurement in Ukraine (the data of 1995) are: propolis – 20 tons, pollen – 100 tons, bee venom – 200 kg, honey – 40,000-60,000 tons, royal jelly – 100 kg and wax – 800 tons. This amount is sufficient for industrial production of drugs, besides it is a domestic raw material that is always at hand, and its transport costs are negligible.

Since ancient times bee products are widely used in folk medicine to treat various diseases [19]. Fundamental research of domestic and foreign scientists has proven their high biological value and versatile pharmacological activity (anti-inflammatory, antimicrobial, anesthetic, antioxidant, immune-stimulating, antiradiation, antiulcer, hepatoprotective, etc.). Moreover, they are practically harmless to the human body [2, 3, 4, 8, 10, 15, 18].

Today specialized companies of Romania, Germany, France, Spain, Canada, Japan, Czech Republic and

others produce a rich variety of bee products. In addition, analysis of the literary data has shown that a lot of publications are devoted to the research concerning the use of apidrugs in medical practice: in dermatology, surgery, gynecology, otolaryngology, dentistry and especially gastroenterology [3]. For example, in the treatment of stomach ulcers disappearance of heartburn, pain, improvement of appetite and the patients' general state are observed from the first days of administration of a combination of propolis with rosehip oil and vitamin E [3, 8, 10].

In treatment of chronic gastritis with low acidity of the gastric juice a good result is achieved when using honey and kalanchoe emulsions with propolis and aloe juice. This treatment promotes regeneration of the mucous membrane of the stomach, improves the blood circulation and stimulates the gastric secretion. In cases when intake of honey causes heartburn, propolis and oil solution with vitamin E is used.

The advantage of apidrugs is the fact that they (unlike, for example, antibiotics) do not damage the normal intestinal microflora, and only inhibit pathogens (this treatment does not lead to dysbiosis) [8]. Moreover, if antibiotics inhibit the body's defenses, on the contrary, drugs with propolis stimulate them. They also have other pharmacological properties that are very useful in the treatment of peptic ulcer and other gastrointestinal diseases [8, 19].

Propolis drugs are multi-component systems of biologically active substances. They contain more than 50 sub-

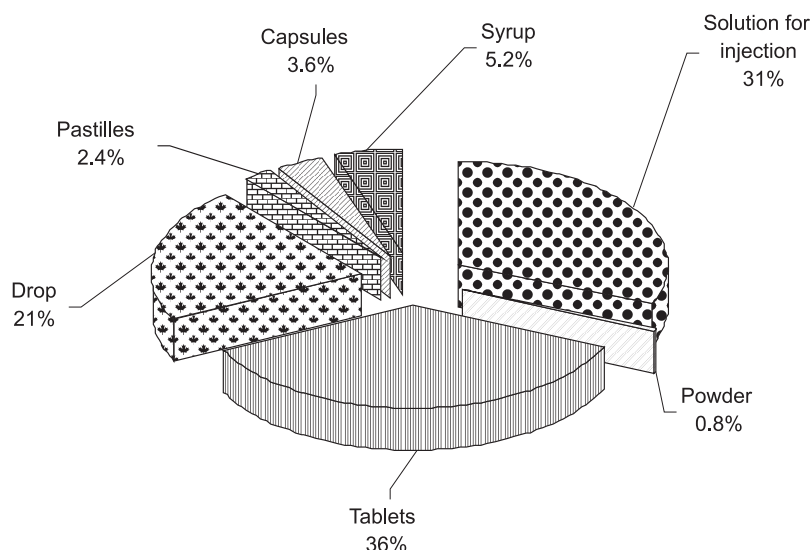


Fig. 1. The share of capsules at the pharmaceutical market compared to other dosage forms for internal administration.

stances of different chemical poisons. The main groups are resins, balms, essential oils and wax, as well as minerals, vitamins, amino acids (from 8 to 17) and others. It has been found that flavonoids are more than 25% of all components of propolis.

Investigations of such researchers as S.A.Popravko, O.I.Tikhonov, V.I.Litvinenko and others have shown that flavones (luteolin, apigenin, etc.), flavonols (quercetin, kaempferol, etc.), flavanones, phenolic acids (caffeic, coumaric, ferulic, etc.) are in the composition of propolis. The presence of terpenoids, such as acetoxybetulenol, bisabolol, aromatic aldehyde, isovanillin, benzoic acid has been also found. In this regard, academician Tikhonov O.I. developed waste-free processing of the raw propolis, and it allowed to offer the Ukrainian healthcare a number of purified biologically active standardized substances of propolis and apidrug created on their basis [4, 5, 6, 7, 8].

Taking into consideration the abovementioned, we have studied almost all types of dosage forms, which are the most optimal for development of drugs, have a high therapeutic efficacy, bioavailability, and are currently being developed in a small range. As can be seen from Fig. 1, the most interesting is the dosage form in the form of capsules.

Capsules are a very common dosage form in developed countries. For example, in the USP XXIII there are more than 220 articles on capsules, in the BP 1993 they are over 50. This dosage form allows to encapsulate various drugs: hard capsules filled with substances in the solid state (powders, granules, microcapsules, etc.), soft capsules filled with liquid and pasty ingredients. Pure substances, without any additives (e.g. antibiotics) are often used as the content of capsules. In the pharmaceutical industry a direct filling of capsules with medicinal substances is quite common. But some of them do not meet the technological requirements of industrial equipment by their physical and chemical characteristics and can not be filled to the capsular shell without using the special methods to eliminate their technological disadvantages. For example, granulation, introduction of excipients, etc., are widely used.

Capsules are a dosage form; they are often intended for internal use, more rarely for vaginal, rectal, and other routes of administration. There are two types of capsules: soft gelatin capsules (*Capsules molles*) and solid ones with caps (*Capsules dure averculatae*).

Recognition of a capsule dosage form and the growing interest to it is explained by a high bioavailability and a number of advantages. They have a good appearance, can eliminate a bitter taste, an unpleasant appearance or odour of medicinal substances, and many peculiarities such as:

**Stability.** In the manufacture of capsules medicinal substances are not exposed to heat, encapsulation of drugs can be intact (without wet granulation, pressure). Sealed capsule keeps medicinal substances from microbial contamination, exposure to air, light, moisture, dust, mechanical external actions, fluctuations in temperature. Furthermore, the capsule shell provides protection of the mucous membranes from the irritant action of certain medicines, and the latter, in turn, from the destructive effect on digestive enzymes.

**A high bioavailability.** Gelatin capsules are readily soluble, permeating for digestive juices, and the pharmacological action of the medicinal substance reveals rather quickly (in an average of 4-8 min).

Rather high bioavailability of encapsulated dosage forms is explained by the fact that the composition of the shell includes gelatin – the product of partial hydrolysis of the collagen-containing raw material. Collagen is the main protein component of fibrous connective tissues of mammals. In the basis of its protein molecule there is a polypeptide chain formed by twelve amino acids, most of which are essential to the human body. The main acids are glycine (27%), proline (16%), oxyproline (14%), lysine (5%) and others. Gelatin is easily and rapidly absorbed even in severe disorders of the gastrointestinal tract; moreover, it is indifferent and non-toxic.

**Ease of use.** Gelatin capsules are odourless and tasteless, and thanks to their shape and surface properties they are easy to use. As mentioned above, the basic ma-

Table

Classification of hard capsules by size

Number	000	00	0	1	2	3	4	5
Average capsule size, cm <sup>3</sup>	1.37	0.95	0.68	0.5	0.37	0.3	0.21	0.13

terial of the shell is gelatin, which is a natural protein that is easily digestible by the body. In oral administration the gelatin shell is wetted with saliva in the mouth, glides well, thus, a capsule slips easily even with a slight gulp. The shell quickly swells and dissolves in the gastrointestinal tract. Capsules can be transparent or opaque, painted in different colours (to prevent photochemical reactions of photosensitive substances, giving capsules a good marketable appearance).

When encapsulating the undesirable effects of moisture (as in wet granulation) or pressure (as in pressing tablets) for some labile substances can be avoided. The content of capsules may be solid or pasty (for gelatin capsules with caps) and consists of one or more medicinal substances with a possible introduction of various excipients approved for medical use.

*Focus of the therapeutic action.* The ability to provide a medicinal product specific properties is achieved by introduction of excipients to the walls of the capsule, their tanning or coating with special films. Due to it, to obtain capsules with different release rates and localization of drug action is possible.

*Physiological inertness.* Modern production of capsules is fully mechanized. With the automated method of filling a high accuracy of dosing (with standard deviation of  $\pm 3\%$ ) and the minimal loss of drugs are guaranteed.

The advantages of gelatin capsules listed provide them a wide distribution in medicine. The disadvantages of capsules include their hygroscopicity, which prevents encapsulation of aqueous solutions, and the need to satisfy certain conditions of storage.

Medicinal substances used to fill gelatin capsules should be dosed at temperatures not exceeding 35°C in order to prevent softening and destruction of capsules. In addition, they should not dissolve the capsule shell, do not have any negative impact, do not evolve gaseous substances, do not increase in volume in order not to cause tearing of capsules, as well as not to cause tanning of capsules from the inside and reduction of their solubility in the gastrointestinal tract.

In industry, to fill gelatin capsules the automated complete production lines equipped with elements of robotics, electronics and microprocessor technology with efficiency of several hundred thousand capsules per shift are used. In addition to the main technological processes in manufacturing capsules there are auxiliary processes associated with regeneration of wastes, sorting and packing capsules, etc. On the automated lines capsules closed with caps are delivered automatically from the storage drum, substandard and nonstandard capsules are rejected, other capsules are oriented in a position comfortable for filling, caps are opened, capsules are filled with a powdered or granulated medicinal

substance, then they are closed, substandard and empty capsules are rejected and collected in special containers. The filled capsules are delivered for dispensing and packing. Dosing on such automatic lines is carried out by volume using piston-type, vacuum, screw or vibration dosing devices (accuracy of dose  $\pm 2\%$ ).

Hard capsules (see their classification in Table) have the shape of a cylinder with hemispherical ends and consist of two parts: a shell and a cap; both parts must be free to enter one another without forming gaps. The inner diameter of the cap should match the outer diameter of the shell. They have special grooves and projections for the "lock" that prevents opening the capsule during transportation. When connecting two parts they form a standard-size container. Capsules should have a smooth surface with no visible damage and mechanical or air inclusions. For coloration of capsules such dyes as tartrazine, indigo, titanium dioxide, and their various mixtures, which are permitted for medical application, are used.

Gelatin is a favourable medium for the growth and reproduction of microorganisms; in its composition there are stabilizing and preserving agents such as sodium metabisulphate, benzoic acid, sodium benzoate, etc. To prevent dissolution of capsules in the stomach acetophthalate cellulose (4%) is also introduced to the composition of the capsule mass. Sometimes flavouring agents are added into the capsule mass to give a pleasant odour, and sugar as a sugar syrup is added to improve the flavour of the capsule when swallowing. In some cases, medicinal substances that have the local anesthetic action (benzocaine) are introduced to the composition of the gelatinous mass to form a capsule shell [15, 16, 17].

Humidity and temperature are the factors that affect the gelatin capsule quality. For their best storage it is desirable to keep temperature within 15-20°C and humidity should be 30-40%.

Wide possibilities of prescribing drugs in the form of capsules caused an increase in their production and use around the world. After starting the use of antibiotics that have an unpleasant bitter taste in medical practice there was a growing interest of manufacturers to encapsulated dosage forms. Over the past decades (from the 1950-s) there has been production of modern automatic machines for manufacturing gelatin capsules in industrial-scale volumes, and it has become possible to manufacture encapsulated drugs of different pharmacological groups (anticonvulsants, antiarrhythmic agents, hypnotics, sedatives, anthelmintic agents, laxatives, diuretics, hypocholesterolemic agents, tranquilizers and drugs with the antiulcer action) [7, 9].

The growth rate of manufacturing drugs in capsules is far ahead of other similar indicators concerning solid dosage forms (Fig. 2).

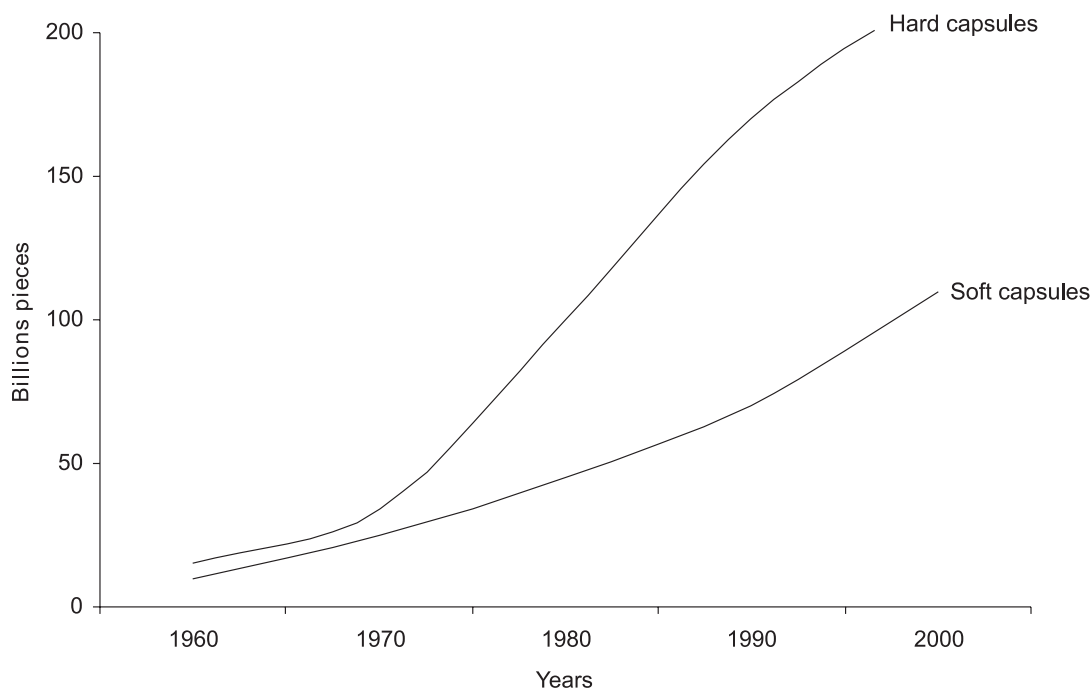


Fig. 2. Production of capsules in the world for the whole period.

But along with this, the nomenclature of encapsulated drugs is small in our country and it is at the stage of development.

Taking into account the abovementioned, we conclude that Ukraine has all the necessary conditions (raw material, research and development, scientific personnel, etc.) for manufacture of domestic solid (capsules) dosage forms from bee products (both in the conditions of a chemist's shop and pharmaceutical factories) and for further development of one of the areas of medicine – apitherapy.

In terms of the above, to solve this problem we have conducted the research on selection and use not only of biologically active substances, but excipients as well.

The term “excipients” summarizes a large group of substances, both of natural and synthetic and semi-synthetic origin. Their use in pharmaceutical technology is always based on the following prerequisites: be indifferent towards the macroorganism; to active ingredients; have forming properties.

In terms of the classical drug technology the latter feature was dominant when choosing and assessing excipients for drug manufacture since a dosage form as the final result is estimated as the form that is the most suitable for application, transportation and storage [17].

With the introduction of the biopharmaceutical concept (G.Levy, J.Wagner) in the pharmaceutical technology in the early 60-s the assessment of excipients as those that provide the creation of a dosage form was changed. At present excipients are considered to be potential carriers of definite biological effects revealed in their combination with medicinal substances. They are an independent integral part of drugs, a component that forms chemical bonds with the active medicinal substance – inclusion compounds. Therefore, introduction of a certain type of excipients in a particular dosage form requires special

studies (biopharmaceutical ones) in terms of their interaction with drugs.

In this respect, science-based application of excipients is one of the objectives of biopharmaceutics – creation of a dosage form with an optimal composition, rational technology and high biological availability [1].

If medicinal substances provide the therapeutic effect of drugs, then excipients serve a dual function: firstly, they help to form the easily dosed mass, and secondly, they provide release of a medicinal substance from the dosage form [11].

The content of excipients should be minimized, or more specifically, it should be optimal, so that their influence reduces to facilitating technology and providing physiological availability. In this regard, the number of some excipients is regulated by certain limits. Thus, the total number of excipients should not exceed 20% of the mass of medicinal substances (excluding diluents, their number is not subjected to limitation). The amount of talc should not exceed 3%, stearic acid, calcium stearate or magnesium, Tween-80 should be 1% of the total mass.

All excipients must be chemically indifferent, do not have a negative effect on the quality of mixtures in their preparation, transportation and storage, should maximize the assimilation of active ingredients by the body. Depending on their purpose they are divided into the following groups: diluents, disintegrating agents lubricants, adhesives, adsorbents, corrigents.

The group of diluents include substances that are used to produce the required weight of capsules when a medicinal substance is in their composition in small doses (0.01-0.001 g). The main substances used for this purpose are beet and milk sugar, glucose, sodium chloride, urea, calcium sulphate, basic magnesium carbonate, calcium hydrogen phosphate, etc. Mannitol, sorbi-

tol, bentonite, sodium bicarbonate, dextrose, starch can be used as a diluent. Recently the arsenal of fillers has been replenished with such substances as cellulose derivatives, modified starches and others. Numerous studies have demonstrated the possibility of using cellulose derivatives, including microcrystalline cellulose, etc., as fillers [8, 14].

The USP also recommends such diluents as calcium carbonate, dibasic calcium phosphate, tribasic calcium phosphate, calcium sulphate, microcrystalline cellulose, powdered cellulose, dextrans, dextrin, dextrose, fructose, kaolin, lactose, mannitol, sorbitol, starch, gelatinous starch, sucrose, pressed sugar, confectioner's sugar.

The role of diluents in the manufacture of capsules is rather significant: they largely determine stability of a drug, the extent and rate of its digestion.

Lubricants are substances that improve the flowability of the powder mixture when filling of capsules, as well as reduce adhesion of the mass to machine parts, collectors, etc. Improved flowability of the material is needed for fast, accurate and uniform filling of capsules. As a result of good lubricity of the mass, the continuous operation of the encapsulation system and uniform dispensing of drugs are achieved.

Substances that enhance lubricity include calcium stearate, glycerol behenate, clarified mineral oil, polyethylene glycol, stearine sodium fumarate, purified stearic acid, talc, hydrogenated vegetable oil, zinc stearate, starch, fat-free milk powder, aerosil, calcium silicate, magnesium silicate, colloidal silica. Recently the use of talc is limited because it is not indifferent [19].

To reduce sticking of the material to machine parts the substances, which are often called antiadherent substances or adhesives such as stearic acid, its calcium and magnesium salts, hydrocarbons (ceresin, liquid and solid paraffin) silicon carbon, are used.

By the mechanism of the lubricity action lubricants are divided into three groups:

- substances that improve the flowability of granules (starch, talc, polyethylene glycol, aerosil);

- antiadhesive substances (stearic acid, paraffin, silicone lubricants);
- substance of the mixed type (calcium, magnesium, and aluminum stearate).

Adsorbents are substances added to the powder mixture in cases where it is composed of oils, fats and hygroscopic components. Absorbing the excessive moisture adsorbents provide flowability of the mass, that is why they are also called hydrostats. Bentonites, kaolin, aerosil, magnesium oxide and basic carbonate, aluminum oxide hydrate are also used as adsorbents.

There is no sense to use corrigents in the manufacture of capsules because the gelatin shell masks the taste and odour of medicinal substances; in addition, they do not require introduction of a binder if the manufacturing process does not include the stage of preliminary granulation [7, 14].

Analyzing the abovementioned, the next stage of our research will be to identify physical, chemical and technological properties and characteristics of standardized biologically active substances of bee products, excipients and their mixtures for creating an encapsulated dosage form, i.e. fluidity, the angle of repose, bulk weight, bulk density, moisture content and moisture absorption, selection of the number of capsules by the known methods.

#### CONCLUSIONS

1. It has been shown that a topical issue of the pharmaceutical science today is development of the rational therapeutic dosage forms for prevention and treatment of ulcer diseases of the human gastroduodenal area.

2. The pharmaceutical market of drugs with the anti-ulcer activity of different dosage forms has been analyzed.

3. Research in recent years has confirmed that the choice of a rational dosage form of medicinal substances in combination with excipients provide the optimal pharmacological effect of drugs under development. Today encapsulated dosage forms are promising; their production is possible both in industrial and pharmacy conditions.

#### REFERENCES

1. Балткэйс Я.Я., Фатеев В.А. *Взаимодействие лекарственных веществ*. – М.: Медицина, 1991. – С. 301.
2. Богдан Н.С., Тихонов О.И. // *Вісник фармації*. – 2014. – №1 (77). – С. 7-11.
3. Измалкова Н.А. *Чудодействие пчелы*. – Воронеж: Центр.-Чернозем. книжное изд-во, 1991. – 80 с.
4. Кожура І.М., Мусяківська А.О., Давидова Г.І. // *Пасіка*. – 1996. – №12. – С. 13-15.
5. Лудянський Є. // *Пчеловодство*. – 1991. – №10. – С. 48.
6. *Пчелы, мед и здоровье человека*. – М.: Калита, 1994. – 223 с.
7. Романова Е.Б. // *Хим.-фарм. журн.* – 1990. – Т. 24, №8. – С. 51-52.
8. *Технология лекарственных форм / Под ред. Т.С.Кондратьевой*. – М.: Медицина, 1991. – Т. 1. – С. 251-277.
9. Тихонов А.И., Будникова Т.Н., Меркурьева Г.Ю. // *В сб. «Апитерапия и пчеловодство»*. – Гадяч, 1991. – С. 167-174.
10. Тихонов А.И., Скрыпник С.А., Ярных Т.Г., Вишневская Л.И. // *Проблемы фармации, подготовки и использования провизорских кадров: Матер. респ. науч. конф. по фармации и фармакол.* – Пятигорск, 1993. – С. 123-124.
11. Тихонов А.И., Ярных Т.Г., Будникова Т.Н. и др. // *Фарм. журн.* – 1991. – №3. – С. 55-58.
12. Тришкова Л.А., Корбут О.В., Крамарев С.А. и др. // *Апитерапия и пчеловодство*. – 1991. – Вып. 2. – С. 104-110.



13. Шуб Т.А. Антимикробная активность прополиса: вопросы стандартизации контроля качества. – Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 1982. – 20 с.
14. Ясницкий Ф.Ю. Современные тенденции создания и применения вспомогательных веществ лекарственных препаратов // Состояние перспективы создания новых лекарственных средств и фитохимия препаратов: Тез. докл. Всесоюзн. науч.-техн. конф. – Х., 1990. – С. 65.
15. Lisa Milena, Ueieertova Irena, Balloun Jan // Folia Pharm. Univ. Caroliniae. – 1989. – №13. – P. 29-44.
16. Seifert M., Haslinger E. // Liebig's Ann. Chem. – 1998. – №11. – С. 1123-1126.
17. Siluta B. // J. Cron. Farm. – 1985. – Vol. 31. – S. 237-248.
18. A.C. 248590 СССР, МКИ4 А 61 К 35 / 64 Spособ pripravvy praskovaho propolisu / Lamanova Jarmila, Kovar Jozef, Skubia Frantisek. – №5054-85. Заявл.: 05.07.85. Опыбл.: 01.01.89.
19. Tichonov A.I., Jarnych T.G., Czernych W.P. et al. Teoria i praktyka wytwarzania leczniczych preparatow propolisowych. – М.: Apipol Farma, 2011. – S. 274.
20. Tichonow A.I., Sodzawiczny K., Tichonowa S.A. et al. Pylek Kwiatowy obnoze pszczele w farmacji I medycynie. – М.: Apipol Farma, 2008. – S. 273.
21. Tichonow A.I., Bodnarchuk L.I., Tichonowa S.A. et al. Jad pszczeli w farmacji I medycynie. – М.: Apipol Farma, 2011. – S. 240.
22. The United States Pharmacopeia XXI. The National Formulary XVI. – 1985. – 1683 p.

### **МЕТОДОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ КАПСУЛЬОВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ З ПРОДУКТАМИ БДЖІЛЬНИЦТВА. Повідомлення II**

**Н.С.Богдан, О.І.Тихонов**

**Ключові слова:** продукти бджільництва; гранули; капсули; противиразкова дія

На основі експериментальних досліджень авторами показано, що актуальною темою фармацевтичної науки сьогодення є розробка раціональних терапевтичних лікарських форм на основі біологічно активних стандартизованих субстанцій продуктів бджільництва, які мають специфічні хімічні і фармакологічні властивості для створення нових вітчизняних, природних, високоефективних лікарських засобів для профілактики та лікування виразкових захворювань гастродуоденальної зони людини. Проаналізовано фармацевтичний ринок лікарських препаратів противиразкової активності різних лікарських форм і з'ясовано, що лікарські форми, які виробляються в незначному асортименті, є економічно і соціально доцільними для подальшої розробки нового лікарського препарату на основі продуктів бджільництва. На теперішній час наукою доведено, що перспективними у даних дослідженнях є капсульовані лікарські форми. Досліджувана лікарська форма економічно вигідна та дозволяє капсулювати різноманітні лікарські засоби: від речовин, які знаходяться в твердому стані, до рідких і пастоподібних інгредієнтів. Науковими дослідженнями останніх років підтверджено, що вибір раціональної лікарської форми лікарських речовин у комплексі з допоміжними сполуками забезпечує оптимальну фармакологічну дію розроблюваних препаратів, виготовлення яких можливе як у промислових, так і в аптечних умовах.

### **МЕТОДОЛОГІЯ СОЗДАНИЯ КАПСУЛИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С ПРОДУКТАМИ ПЧЕЛОВОДСТВА. Сообщение II**

**Н.С.Богдан, А.И.Тихонов**

**Ключевые слова:** продукты пчеловодства; гранулы; капсулы; противоязвенное действие

На основе экспериментальных исследований авторами показано, что актуальной темой фармацевтической науки сегодня является разработка рациональных терапевтических лекарственных форм на основе биологически активных стандартизованных субстанций продуктов пчеловодства, которые имеют специфические химические и фармакологические свойства для новых отечественных, природных, высокоэффективных лекарственных средств для профилактики и лечения язвенных заболеваний гастродуоденальной зоны человека. Проанализированы фармацевтический рынок лекарственных препаратов противоязвенной активности различных лекарственных форм и выяснено, что лекарственные формы, которые производятся в незначительном ассортименте экономически и социально целесообразны для дальнейшей разработки нового лекарственного препарата на основе продуктов пчеловодства. Сегодня наукой доказано, что перспективными в данном исследовании являются капсулированные лекарственные формы. Данная лекарственная форма экономически выгодна и позволяет капсулировать различные лекарственные средства, начиная с веществ, которые находятся в твердом состоянии, до жидких и пастообразных ингредиентов. Научными исследованиями последних лет подтверждено, что выбор рациональной лекарственной формы лекарственных веществ в комплексе со вспомогательными соединениями обеспечивает оптимальное фармакологическое действие разрабатываемых препаратов, изготовление которых возможно как в промышленных, так и в аптечных условиях.

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor O.M.Kotenko*

UDC 615.453:615.076

## **BIOAVAILABILITY RESEARCH OF SOLID MEDICINAL FORMS BY THE EXAMPLE OF BISOPROLOL FUMARATE TABLETS IN RELATION TO THE BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM**

S.M.Gureeva

“Farmak” Joint-Stock company

*Key words: biopharmaceutical classification system; solid medicinal forms of industrial production; kinetics of release; physical and chemical properties of active substances; biowaiver; bioequivalence*

---

*The place and role of the biopharmaceutical classification system have been substantiated in the article, the essence and content of biowaiver have been revealed, as well as their use in pharmaceutical development of bioequivalent solid dosage forms has been described. A new direction has been presented. It is discovery and study of physical and chemical regularities of using active pharmaceutical ingredients, which influence on their pharmacological action. The dependence of the active substance on technological factors, i.e. features of the pharmaceutical technology, has been studied. It has become possible due to the use of modern perfect methods of estimation of drug efficiency and mainly the possibility of determination of the content of active substances and their metabolites in biological fluids, and it is necessary when considering a question about the therapeutic equivalence of medicines. On the example of the active substance – bisoprolol fumarate, which belongs to class I in accordance with the biopharmaceutical classification system, the kinetics of release and bioequivalence have been studied. The kinetics of release of the active substance of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and the corresponding original medicine “Concor tablets, 10 mg” has been studied in the pH medium of 1.2; 4.5; 6.8. It has been proven that development of a new medicinal form is a difficult process of the experimental research, therefore, for optimization of development of the composition and technology of medicines under conditions of the laboratory of industrial pharmacy it is necessary to use the most effective methods and methods of biopharmaceutical research, one of which is the research of bioequivalence of solid dosage forms based on the study of physical and chemical properties of active substances using the biopharmaceutical classification system.*

---

At the present stage of development of the pharmaceutical industry scientists are trying to establish the dependence of action of drug substances on technological factors, i.e. features of the pharmaceutical technology. It has become possible due to the use of modern perfect methods of estimation of drug efficiency and mainly the possibility of determination of the content of active substances and their metabolites in biological fluids, and it is necessary when considering a question about the therapeutic equivalence of medicines. The results of this research are widely used to improve the efficiency of medicines and reduce their side effects.

For optimization of research of technological and biopharmaceutical indicators of active substances depending on their physical and chemical properties the drug classification systems are used in pharmacy; they are used as means to establish relationships or orientation in various notions of the corresponding objects performing the function of the unified description of the range of medicines that are present at the pharmaceutical market in order to compare the volume of their consumption at the national or international levels. Classification systems compare standardized and validated information on the use of a medicine to check and determine the structure of consumption, revealing draw-

backs when using, initiating educational and other special events (for example, the classification of drug adverse reactions, the study of the structure of antibiotics consumption in different regions or individual countries in order to strengthen the fight against antibiotic resistance, etc.), as well as monitoring the outcomes of these activities. In the second half of the twentieth century the WHO proposed several uniform systematics of medicines deprived of drawbacks of the classifications used previously. They combine some classification principles such as the mechanism of drug action, indications and the chemical structure of the active pharmacological ingredient (API) that is present [3].

At present the Anatomical Therapeutic Chemical classification (ATC) system is widely used with the purpose of obtaining statistical data on the drug consumption at the regional or international level, the drug market research, needs of production, classification of adverse reactions of medicines, etc. With the help of ATC classification medicines can be encoded, their possible use in therapy, potency and composition can be determined. According to ATC classification all medicines are divided into five main groups depending on their action on a particular anatomical organ or system, and their chemical, pharmacological, therapeutic and chemical

properties. At the first level there are 14 major anatomical groups marked with one Latin letter: A – medicines affecting the digestive system and metabolism; B – medicines affecting blood system and hemopoiesis; C – medicines affecting the cardiovascular system, etc. Each group, in turn, is divided into therapeutic / pharmacological subgroups (the second and third level). The fourth level is presented by therapeutic / pharmacological / chemical subgroups; the fifth one – by a chemical substance (API). The second – the fourth levels of medicines are often used to identify pharmacological subgroups (when it is more appropriate than determination of therapeutic and chemical subgroups). The Biopharmaceutics Classification System (BCS) considers the relationship of the three indicators – solubility of the drug substance, its dosage form dissolution and penetration of APIs from the intestine after oral use into the systemic circulation [2].

According to BCS all drug substances are divided into four classes based on solubility in biological fluids and permeability through biological membranes in the gastrointestinal tract after oral administration.

The first class (I) of BCS includes active substances with a high solubility and permeability having high indicators of absorption and bioavailability.

The second class (II) of BCS are the active substances characterized by a low solubility, but a high permeability through biological membranes, they differ by optimal indicators of absorption and bioavailability.

The third class (III) of BCS combines active substances with a high solubility, but a low permeability through biological membranes, they differ by limited absorption and bioavailability.

The fourth (IV) class includes active substances with a low solubility and low permeability, they differ by problematicity as for absorption and bioavailability [1].

The aim of the work is to prove bioequivalence of solid dosage forms on the basis of the study of physical and chemical properties of active substances using the biopharmaceutical classification system.

### Experimental Part

Within the biopharmaceutical concept medicines are considered as a dialectically integrated specific physical chemical system, taking into account the impact of mandatory variables (pharmaceutical, physiological, biochemical) that acquire biological significance and influence on the drug efficiency and formation of their bioequivalence. The drug efficiency can be determined only by a careful study of the impact of both pharmaceutical and biological variables, each of which causes a dominant influence on the various stages of the “life” of a drug, beginning with creation and ending with its production and the rational use [2, 3].

Physical and chemical and technological properties of active substances are essential features when selecting the optimal composition of new effective and available dosage forms, as well as improvement of the quality of production of the known dosage forms that differ by the optimal life cycle at the world and domestic pharmaceutical markets.

At the current stage a new direction develops in the pharmaceutical industry; it is discovery and study of physical and chemical regularities of using medicinal substances, which affect their pharmacological action. First of all, scientists are trying to establish a relationship of the active substance on technological factors, i.e. features of the pharmaceutical technology. It has become possible due to the use of modern perfect methods of estimation of drug efficiency and mainly the possibility of determination of the content of active substances and their metabolites in biological fluids, and it is necessary when considering a question about the therapeutic equivalence of medicines. The results of these studies are widely used to improve the efficiency of medicines and reduce the risk of side effects. At this stage, the role of pharmaceutical factors has been proven. During experiments the influence of the physical condition: the degree of fractionation, solubility, polymorphism and other pharmaceutical factors on the activity of medicinal substances has been confirmed. Modern methods of predicting the shelf life of drugs in most cases based on decomposition of active substances. Using physical and chemical factors that slow down chemical reactions (temperature, pH, light, humidity, etc.) the changes that active substances are subjected in the process of storage can be checked in the short period of time [6, 7].

Pharmaceutical factors have a particular impact on the therapeutic efficacy of medicines. They include five groups: chemical modification of a drug substance (salt, acid, the presence of ether bonds, complex compounds); the physical and chemical state of a drug substance (crystal form, particle sizes, the presence or absence of the charge on their surface, etc.); excipients, their nature, number, the type of dosage form and the route of administration; excipients and pharmaceutical technology [8, 9, 10].

### Results and Discussion

We believe that along with these factors it is necessary to identify the interaction of active substances and excipients, which are part of the dosage form and their impact on the therapeutic efficacy of the dosage form, dynamics and kinetics of release of the active ingredient, its bioavailability and bioequivalence.

On the example of the active substance – bisoprolol fumarate, which belongs to class I in accordance with the biopharmaceutical classification system, the kinetics of release and bioequivalence have been studied. Since according to the biopharmaceutical classification system the substance of bisoprolol fumarate belongs to class I of substances with a high solubility and permeability and has high indicators of absorption and bioavailability, in order to confirm *in vitro* similarities of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate of “Farmak” JSC with the corresponding original medicine “Concor tablets, 10 mg” the study of the kinetics of release of the active substance (bisoprolol fumarate) was performed in 3 standard media:

- 1) pH 1.2: the mixture of 0.2 M solution of hydrochloric acid and 0.2 M solution of sodium chloride;
- 2) pH 4.5: the mixture of the solution of 2.99 g/l of sodium acetate and 14.0 ml/l of 2 M solution of acetic acid;

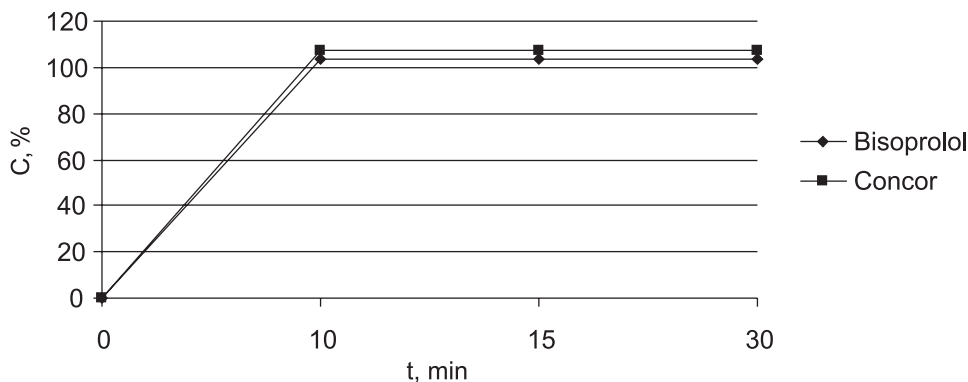


Fig. 1. The kinetics of release of the active substance of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and the original medicine "Concor tablets, 10 mg" in the pH medium of 1.2.

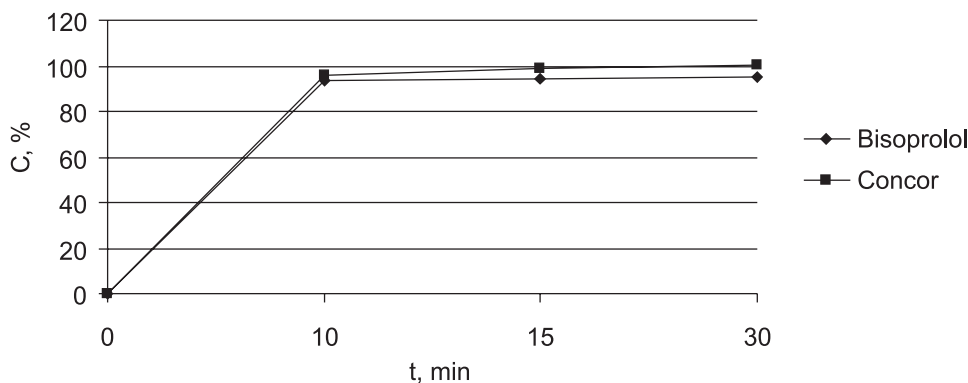


Fig. 2. The kinetics of release of the active substance of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and the original medicine "Concor tablets, 10 mg" in the pH medium of 4.5.

3) pH 6.8: the mixture of 0.2 M solution of potassium dihydrogen phosphate and 0.2 M solution of sodium hydroxide.

The study of release of the active substance was performed on the devices for dissolution "Erweka DT 800" and "Erweka DT 700". For research we used a type of the device with a basket rotating with the rate of 100 rpm.

The volume of the dissolution medium was 900 ml. The temperature of the dissolution medium maintained automatically was 37±0.5°C. The release profiles of the active substance of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and the corresponding original medicine "Concor tablets, 10 mg" is shown in Fig. 1, 2 and 3.

As can be seen from the data, the kinetics of release of bisoprolol fumarate from 10 mg tablets and the original medicine "Concor tablets, 10 mg" is completely the same and does not depend on the pH medium of release. The full agreement of the profile and the amount of the active substance release referring bisoprolol fumarate to the first class of BCS allows to predict bioequivalence of medicines and to register them according to biowaiver.

Development of a new dosage form is a complex multistaged process of the experimental research, therefore, for optimization of development of the composition and technology of medicines under conditions of the laboratory of industrial pharmacy it is necessary to use the most effective methods and methods of biopharmaceutics.

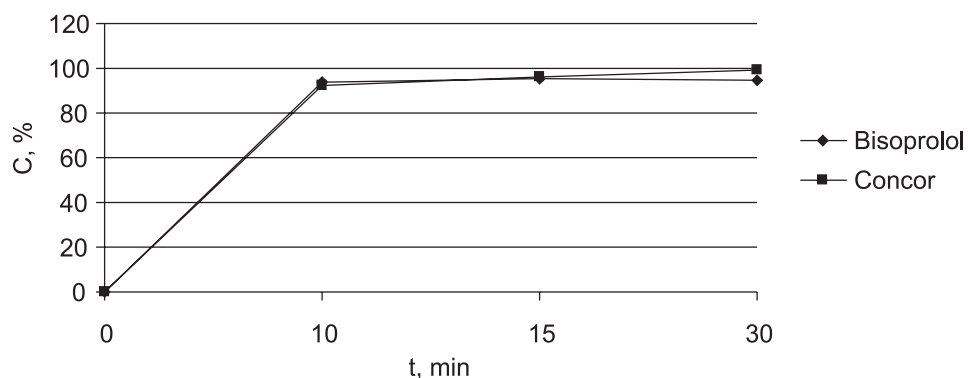


Fig. 3. The kinetics of release of the active substance of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and the original medicine "Concor tablets, 10 mg" in the pH medium of 6.8.

tical research, one of which is the research of bioequivalence of solid dosage forms based on the study of physical and chemical properties of active substances using the biopharmaceutical classification system.

#### CONCLUSIONS

The kinetics of release of the active ingredient – 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and the corresponding original medicine “Concor tablets, 10 mg” in the pH me-

dium of 1.2; 4.5; 6.8 has been studied. The results obtained have shown that during the first 15 minutes under these conditions more than 85% of the active substance of both the reference medicine “Concor tablets, 10 mg” and the test medicine “Bisoprolol tablets, 10 mg” have been released; the release profiles of 10 mg tablets of bisoprolol fumarate and original medicine “Concor tablets, 10 mg” are completely the same.

#### REFERENCES

1. Головенко М.Я., Баула О.П., Борисюк І.Ю. Біофармацевтична класифікаційна система. – К., 2010. – 300 с.
2. Кондратенко С.Н. Фармакокинетические факторы абсорбции лекарственных препаратов: Дисс. ... докт. фарм. наук. – М., 2003. – 287 с.
3. Перцев І.М., Рубан О.А., Тамм Т.І., Дмитрієвський Д.І. // Щотижневик «Аптека». – 2012. – №23 (844). – С. 8.
4. Тенцова А.И. // Фармація. – 2012. – №3. – С. 3-4.
5. Bioequivalence of bisoprolol fumarate tablets in healthy volunteers[J] / ZHOU Xia~1 DING Li~1 HE Jianchang~2 XU Gui-li~2 GUO Xiao-feng~1 CHEN Guo-wei~1 1 Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2 Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, China // Chinese J. of New Drugs. – 2007. – P. 20.
6. Biopharmaceutics Classifications System (BCS) / Ketoprofen. URL <http://www.strinc.com//services/bcs/results/cfm>.
7. Classification of torasemide based on the Biopharmaceutics Classification System and evaluation of the FDA biowaiver provision for generic products of Class I drugs / M. Zahirul I. Khan etc. // J. of Pharmacy and Pharmacol. – 2006. – Vol. 58, Issue 11. – P. 1475-1482.
8. Drugs and pharmaceutical sciences. Modified-Release Drug Delivery Technology / Ed. by M.J.Rathbone, J.Hadgraf, M.S.Roberts. – New York – London, 2008. – Vol. 151. – 538 p.
9. Drugs and the pharmaceutical Sciences. Pharmaceutical Process Scale-Up / Ed. by M.Levin. – New York – London, 2011. – Vol. 157. – 548 p.
10. Satish K. Nachaegari, Arvind K. Bansal // Pharm. Technol. – 2004. – P. 52-64.

### ДОСЛІДЖЕННЯ БІОДОСТУПНОСТІ ТВЕРДИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ НА ПРИКЛАДІ ТАБЛЕТОК БІСОПРОЛОЛУ ФУМАРАТУ ВІДПОВІДНО ДО БІОФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КЛАСИФІКАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ

С.М.Гурєєва

**Ключові слова:** біофармацевтична класифікаційна система; тверді лікарські форми промислового виробництва; кінетика вивільнення; фізико-хімічні властивості діючих речовин; процедура біоєквівалентності

В статті обґрунтовані місце та роль біофармацевтичної класифікаційної системи, розкрито сутність і зміст процедури біоєквівалентності та їх використання у фармацевтичній розробці біоєквівалентних твердих лікарських форм. Розкрито новий напрям – відкриття та вивчення фізико-хімічних закономірностей використання активних фармацевтичних інгредієнтів, що впливають на їх фармакологічну дію. Досліджено залежність діючих лікарських речовин від технологічних факторів, тобто від особливостей фармацевтичної технології, що стало можливим завдяки використанню сучасних досконалих методів оцінки ефективності ліків і, в основному, можливості визначення вмісту діючих речовин, їх метаболітів у біологічних рідинах, що є необхідним при розгляді питання терапевтичної еквівалентності ліків. На прикладі діючої речовини – бісопрололу фумарату, яка відноситься до першого класу у відповідності до біофармацевтичної класифікаційної системи, досліджено кінетику вивільнення та біоєквівалентність. Висвітлено дослідження кінетики вивільнення діючої речовини бісопрололу фумарату з таблеток 10 мг та з відповідного оригінального лікарського засобу «Конкор, таблетки 10 мг» у середовищі рН 1,2; 4,5; 6,8. Одержані результати показали, що за перші 15 хв у зазначених умовах вивільняється більше 85% діючої речовини як з препарату порівняння «Конкор, таблетки 10 мг», так і з досліджуваного препарату «Бісопролол, таблетки 10 мг». Доведено, що розробка нової лікарської форми є складним багатоступеневим процесом експериментальних досліджень, отже для оптимізації розробки складу і технології лікарських засобів в умовах лабораторії промислової фармації необхідно використовувати найефективніші методи та методики біофармацевтичних досліджень, одним з яких є дослідження біо-

*еквівалентності твердих лікарських форм на основі вивчення фізико-хімічних властивостей діючих речовин з використанням біофармацевтичної класифікаційної системи.*

## **ИССЛЕДОВАНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ПРИМЕРЕ ТАБЛЕТОК БИСОПРОЛОЛА ФУМАРАТА ОТНОСИТЕЛЬНО БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ**

**С.Н.Гуреева**

**Ключевые слова:** *биофармацевтическая классификационная система; твердые лекарственные формы промышленного производства; физико-химические свойства действующих веществ; процедура биовейвер; биоэквивалентность*

*В статье обосновано место и роль биофармацевтической классификационной системы, раскрыто сущность и содержание процедуры биовейвер, а также их использование в фармацевтических разработках биоэквивалентных твердых лекарственных форм. Раскрыто новое направление – открытие и изучение физико-химических закономерностей использования активных фармацевтических ингредиентов, которые влияют на их фармакологическое действие. Исследована зависимость действующего лекарственного вещества от технологических факторов, то есть от особенностей фармацевтической технологии, что стало возможным благодаря использованию современных совершенных методов оценки эффективности лекарств и, в основном, возможности определения содержимого действующих веществ, их метаболитов в биологических жидкостях, что является необходимым при рассмотрении вопроса о терапевтической эквивалентности лекарств. На примере действующего вещества – бисопролола фумарата, которое относится к первому классу в соответствии с биофармацевтической классификационной системой, исследованы кинетика высвобождения и биоэквивалентность. Отражено исследование кинетики высвобождения действующего вещества бисопролола фумарата из таблеток 10 мг и из соответствующего оригинального лекарственного средства «Конкор, таблетки 10 мг» в среду pH 1,2; 4,5; 6,8. Доказано, что разработка новой лекарственной формы является сложным многоступенчатым процессом экспериментальных исследований, следовательно для оптимизации разработки состава и технологии лекарственных средств в условиях лаборатории промышленной фармации необходимо использовать самые эффективные методы и методики биофармацевтических исследований, одним из которых является исследование биоэквивалентности твердых лекарственных форм на основе изучения физико-химических свойств действующих веществ с использованием биофармацевтической классификационной системы.*

Рекомендована д.ф.н., професором Т.Г.Ярних

УДК 615.451.2+616.594.14

## РОЗРОБКА СКЛАДУ ЕМУЛЬСІЙНОЇ ОСНОВИ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІКАРСЬКОГО КОСМЕТИЧНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ АНДРОГЕННІЙ АЛОПЕЦІЇ

І.О.Ярема, М.І.Федоровська

Івано-Франківський національний медичний університет

*Ключові слова:* андрогенна алопеція; емульсійна основа; емульгатори; желеутворювачі; біофармацевтичні дослідження; мікроскопічні дослідження

### DEVELOPMENT OF THE EMULSION BASE COMPOSITION WHEN CREATING THE MEDICINAL COSMETIC PRODUCT USED IN ANDROGENETIC ALOPECIA

*I.O.Yarema, M.I.Feodorovska*

**Key words:** androgenetic alopecia; emulsion base; emulsifiers; gelation agents; biopharmaceutical research; microscopic research

*Androgenetic Alopecia (AA) treatment nowadays is still a difficult task of trichology and cosmetology as the range of medicines affecting the disease pathogenetic link and being suitable and safe to use is limited. Bearing all that in mind an increased attention is paid to substances of the plant origin based on phytosterols and flavonoids. Phytosterols are inhibitors of 5 $\alpha$ -reductase – the enzyme, which is responsible for appearance of AA, while flavonoids strengthen the cell wall and improve the skin circulation. Taking all that into account it is important to develop a medicinal product (MP) in the form of emulsion for external use, which contains a dry extract of Saw palmetto (rich in phytosterols) and the tincture of Japanese Sophora (the source of flavonoids). The pharmacological activity of medicines for dermatological use largely depends on the nature of a base-carrier of active substances. Thus, the article presents the research results of the emulsion base composition development. At the first stage 16 formulations of the emulsion bases with the pumpkin seed oil introduced in their composition as the oil phase have been considered. Emulsifiers and the gelation agent solutions (sodium alginate, xanthan gum, carboxymethylcellulose, Carbopol) have been used as stabilisers of the heterogeneous system. Identification of the colloid and thermal stability has been performed for the bases that are homogeneous in their appearance immediately after manufacturing. The bases that had been tested were subjected to microscopic and biopharmaceutical research that allowed to find the size and homogeneity of the particles of the oil phase and determine the effectiveness of biologically active substances (BAS) release from the bases-carriers. On the basis of the studies conducted it has been found that the bases that contain gelation agents such as Carbopol, sodium alginate and xanthan gum, emulsifiers – Tween-20 and cetyl alcohol have the optimal properties.*

Щоденне випадіння волосся – явище фізіологічне. Проте в силу різноманітних причин (вплив стресів і токсичних речовин, гормональний дисбаланс, інфекційні захворювання, запальні та аутоімунні процеси, травми шкіри голови тощо) синхронність фаз життєвого циклу волосини порушується. В результаті спостерігається патологічна втрата волосся (алопеція) [11].

Однією з найбільш поширених форм облісіння, що зустрічається у як чоловіків, так і у жінок, є андрогенна алопеція (АА) – прогресуюче облісіння, викликане дією андрогенів на волосяний фолікул у осіб зі спадковою схильністю [6, 12, 13]. Лікування АА на сьогодні залишається складним завданням дерматології, оскільки номенклатура лікарських препаратів, які б впливали на патогенетичну ланку захворювання, обмежена і представлена ЛЗ на основі міноксидилу (2-5% розчини для місцевого застосування) та фінастериду (таблетки для прийому всередину). Вказані препарати характеризуються рядом недоліків, найважливіші з яких: для міноксидилу – потреба в

тривалій терапії, відсутність дії на патогенетичні ланки захворювання, висока вартість; фінастерид протипоказаний жінкам через ембріотоксичний ефект та у чоловіків викликає порушення статевої функції [8, 9, 14].

З врахуванням вищевикладеного розробка лікарських засобів рослинного походження, що впливають на патогенез АА (фітостероли екстракту плодів пальми сабаль), кровообіг волосяних фолікулів (флавоноїди настойки софори японської) та є безпечними при тривалому зовнішньому застосуванні, є актуальним завданням сучасної фармацевтичної науки [7, 10].

Тому метою роботи є опрацювання оптимального складу основи-носія фітоемульсії, призначеної для місцевого застосування при андрогенній алопеції.

#### Матеріали та методи

На першому етапі дослідження проводилась розробка рідкої емульсійної основи, що дозволяла б максимально швидко і повно вивільняти діючі речовини, при цьому повністю вбиралася шкірою голови, не руйнувала водно-ліпідного шару та не обтяжувала во-

Таблиця 1

## Досліджувані склади основ

Назва компонента	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№8*	№9	№10	№11	№12	№13	№14	№15	№16
Олія гарбуза	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Натрію альгінат	1,0	-	-	-	1,0	-	-	-	-	1,0	-	-	-	1,0	-	-	-
Карбопол	-	1,0	-	-	-	0,5	-	-	-	-	1,0	-	-	-	1,0	-	-
Карбоксиметил-целюлоза	-	-	1,0	-	-	-	1,0	-	-	-	-	1,0	-	-	-	1,0	-
Ксантанова камедь	-	-	-	1,0	-	-	-	1,0	0,5	-	-	-	1,0	-	-	-	1,0
Твін-20	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
ПАР з масла солодкого мигдалю	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Ланолін еркалан (ПЕГ-75)	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-	-
Цетиловий спирт	-	-	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-	-	3,0	3,0	3,0	3,0
Вода очищена	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

лося. Попередній практичний досвід свідчить про те, що для створення стійкої емульсійної системи I-го роду необхідно застосовувати велику кількість сильних емульгаторів [1, 4]. Розроблювана лікарська форма призначена для тривалого та частого використання, а отже надмірна кількість емульгаторів може викликати місцеве подразнення, руйнування шкірно-епідермального бар'єру тощо. Тому для одержання стабільної емульсії до складу гетерогенної системи, поряд з емульгаторами першого і другого роду, слід додавати розчини високомолекулярних сполук (ВМС). При виборі емульгаторів зупинилися на речовинах, які застосовуються в складі багатьох косметичних засобів для волосся і шкіри, а саме: твін-20, ПАР з олії солодкого мигдалю (I-го роду), ланолін еркалан (ПЕГ-75), цетиловий спирт (II-го роду). В якості гелеутворювачів було обрано натрію альгінат, ксантанову камедь природного походження, карбоксиметилцелюлозу та карбопол синтетичного походження. Як олійну фазу, застосували олію насіння гарбуза, оскільки вона, крім формоутворюючих властивостей, проявляє антиоксидантну і фолікулопротекторну дію за рахунок вмісту поліненасичених жирних кислот, фітостеринів, вітамінів та мікроелементів [10].

Розроблювані основи оцінювали за органолептичними показниками, визначали колоїдо- та термостабільність. У зразках, що витримали випробування, досліджували біодоступність та дисперсність, використовуючи стандартні методики ДФУ I вид., розділ «М'які лікарські засоби для місцевого застосування»[2]. Ступінь дисперсності та визначення лінійних розмірів часток олійної фази проводили за

допомогою електронного мікроскопа «Delta Optical Genetic Pro» з вмонтованою камерою (об'єктив 40/0,65 160/0.17; окуляр WF 10×/18). Ефективність вивільнення біологічно активних речовин з досліджуваних основ визначали методом дифузії в агар. До складу носіїв вводили по 10% настойки софори японської. В якості реактиву на фенольні сполуки використовували розчин заліза (III) хлориду. Чашки Петрі з досліджуваними зразками поміщали у термостат і при температурі 37°C через кожні 15 хвилин вимірювали діаметр забарвлених зон [2, 3].

**Результати та їх обговорення**

Склади основ наведені у табл. 1. Основи, що не розшарувалися відразу після виготовлення (№№3, 4, 5, 6, 8, 8\*, 12, 15), піддали визначенню колоїдо- та термостабільності. Додатково для оцінки споживчих параметрів було проведено розрахунок комплексного індексу якості [5]. Отримані результати наведені у табл. 2. За даними таблиці видно, що стабільними є зразки з альгінатом натрію, ксантановою камеддю та карбополом, до складу яких в якості емульгаторів входять цетиловий спирт і твін-20.

Вказані основи також досліджували, вивчаючи дисперсність олійної фази та біодоступність. При проведенні мікроскопічних досліджень виявили, що зразки №№4, 12 та 8\* є неоднорідними за дисперсністю, оскільки значний відсоток становлять великі фракції (рис. 1 А-В). Середні розміри часток дисперсної фази знаходяться в межах від 6,2 до 8,1 мкм. Основи №№5 та 8 є більш однорідними з середнім розміром часток дисперсної фази 3,1 (рис. 1 Г) та 4,1 мкм відповідно (рис. 1 Д). Найменший та одно-

Таблиця 2

## Дослідження показників якості емульсійних основ

Показник	№3	№4	№5	№6	№8	№8*	№12	№15
Однорідність	+	+	+	+	+	+	+	+
Термостабільність	-	+	+	+	+	+	+	-
Колоїдна стабільність за 6000 об/хв	-	+	+	+	+	+	+	-
Комплексний індекс якості (max 10)	6,6	7,2	7,3	7,4	8,0	8,1	8,0	8,0



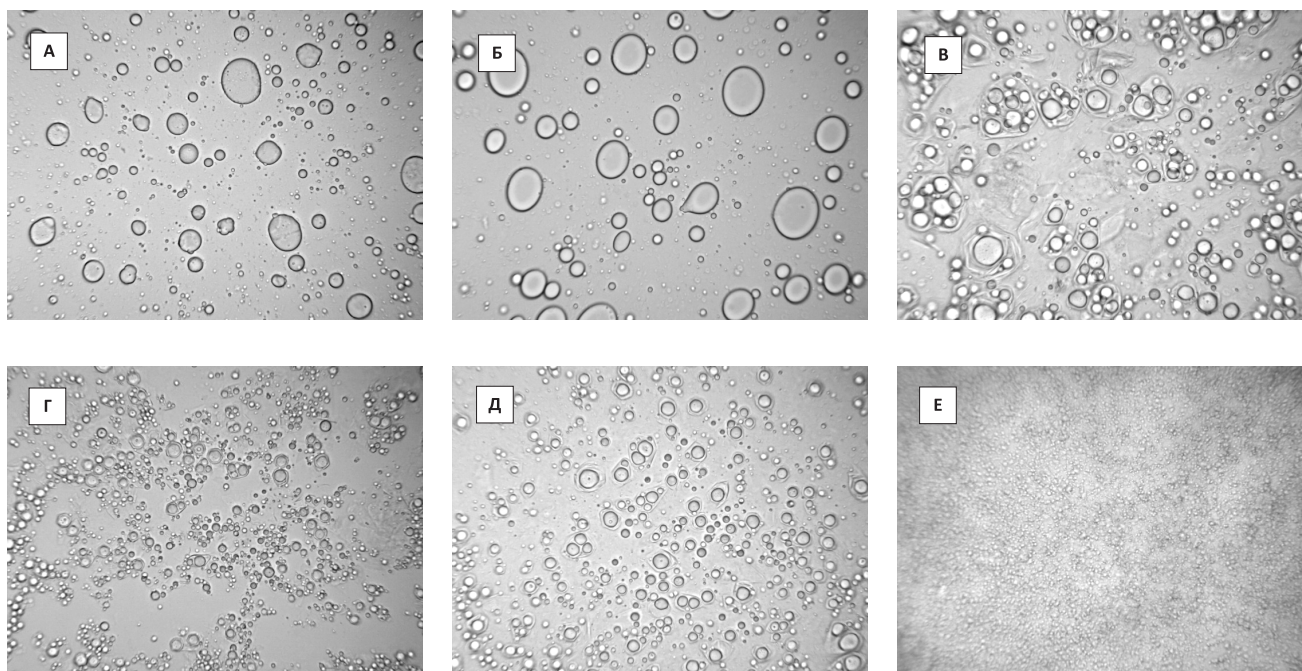


Рис. 1. Дисперсність часток олійної фази: А – основа №4; Б – основа №12; В – основа №8\*; Г – основа №5; Д – основа №8; Е – основа №6.

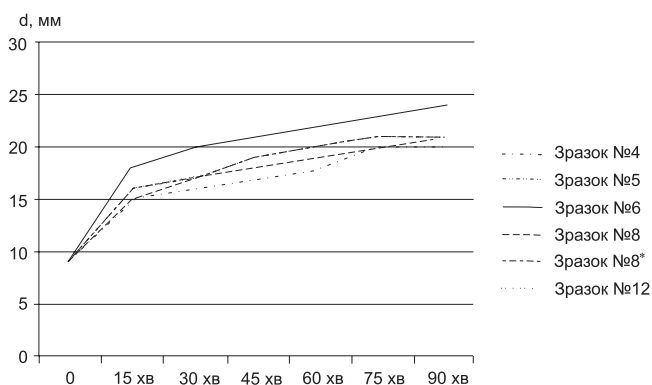


Рис. 2. Діаграма швидкості вивільнення БАР фенольної природи з основ в агаровий гель.

Основа	Час					
	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв	75 хв	90 хв
№ 4	15	16	17	18	20	20
№ 5	16	17	19	20	20	20
№ 6	18	20	21	22	23	24
№ 8	15	17	18	19	20	21
№ 8*	16	17	19	20	21	21
№ 12	16	17	19	20	21	21

рідний розмір часток дисперсної фази має основа №6 з карбополем в якості гелеутворювача (рис. 1 Е).

Однорідність і високий ступінь дисперсності олійної фази впливає на рівномірність розподілу діючих компонентів та швидкість їх вивільнення з основи і, відповідно, на ефективність фармакологічної дії. Біофармацевтичні дослідження показали (рис. 2), що найкраще дифузія діючих речовин фенольної природи в агаровий гель відбувається з основи №6.

Таким чином, на підставі проведених мікроскопічних та біофармацевтичних досліджень, визначення колоїдо- і термостабільності було встановлено, що оптимальними властивостями володіють основи №5, №6 та №8, які вміщують гелеутворювачі карбопол, альгінат натрію та ксантанову камедь, емульгатори твін-20 і цетиловий спирт. У подальших дослідженнях ми плануємо вивчити реологічні вла-

стивості даних основ, опрацювати технологію їх виготовлення, а також вибрати оптимальний спосіб введення діючих речовин до складу лікарської форми.

#### ВИСНОВКИ

1. На підставі показників колоїдо- та термостабільності визначили, що найбільш стійкими до розшарування є основи, до складу яких в якості емульгаторів входять твін-20 та цетиловий спирт.

2. За результатами мікроскопічних досліджень встановили, що найбільшу ступінь дисперсності має основа №6, що вміщує гелеутворювач карбопол.

3. Біофармацевтичними дослідженнями встановлено, що зразки основ з карбополем, альгінатом натрію та ксантановою камеддю активно вивільняють діючі речовини; серед них найвищі показники спостерігались у основи з карбополем.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гладышева С.А., Гладух Е.В. // *Запорожский мед. журн.* – 2008. – №6. – С. 70-71.
2. *Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науковий-експертний фармакопейний центр».* – 1-е вид. – Х.: PIPEP, 2001. – 526 с.
3. *Креми косметичні. Загальні технічні умови: ДСТУ 4765:2007.* – [Чинний від 2009-01-01] – К.: Держспоживстандарт України, 2008. – 7 с. – (Національний стандарт України).
4. Нікітіна М.В., Баранова І.І., Ніколайчук Н.О. // *Фармація.* – 2010. – №4(23). – С. 51-53.
5. Павх О.І., Соколова Л.В., Козир Г.Р., Барна О.М. // *Запорожский мед. журн.* – 2012. – №3 (72). – С. 26-27.
6. Святенко Т.В., Андриуца Л.А. // *Medix. Anti-Aging.* – 2011. – №1(19). – С. 65-69.
7. Chatterjee S., Agrawala S.K. // *Natural Product Radiance.* – 2003. – №2(6). – P. 302-305.
8. Kučerová R., Bienová M., Novotný R. et al. // *Scripta Medica.* – 2006. – №1 (79). – P. 35-48.
9. Messenger A.G., Rundegren J. // *British J. of Dermatol.* – 2004. – №8 (150). – P. 186-194.
10. Patil K.T. // *Res. J. of Pharmac., Biol. and Chemical Sci.* – 2010. – №1 (2). – P. 773-780.
11. Stefanato C.M. // *Histopathol.* – 2010. – №56. – P. 24-38.
12. Trüeb R.M. // *Experimental Gerontol.* – 2002. – Vol. 37. – P. 981-990.
13. Wang E., McElwee K.J. // *Dermatol. Therapy.* – 2011. – №1 (24). – P. 337-347.
14. Yip L., Ruffaut N., Sinclair R. // *Australasian J. of Dermatol.* – 2011. – №52. – P. 81-88.

**РОЗРОБКА СКЛАДУ ЕМУЛЬСІЙНОЇ ОСНОВИ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІКАРСЬКОГО КОСМЕТИЧНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ АНДРОГЕННІЙ АЛОПЕЦІЇ  
І.О.Ярема, М.І.Федоровська**

**Ключові слова:** андрогенна алопеція; емульсійна основа; емульгатори; гелеутворювачі; біофармацевтичні дослідження; мікроскопічні дослідження

Лікування андрогенної алопеції (АА) на теперішній час залишається складним завданням трихології і косметології, оскільки асортимент лікарських препаратів (ЛП), які б впливали на патогенетичну ланку захворювання і були зручними та безпечними у застосуванні, обмежений. Тому підвищену увагу викликають субстанції рослинного походження на основі фітостеролів та флавоноїдів. Фітостероли є інгібіторами 5- $\alpha$ -редуктази – ферменту, що відповідає за виникнення АА, а флавоноїди зміцнюють клітинну стінку та покращують шкірний кровообіг. Враховуючи вищевикладене, слід зазначити, що актуальною є розробка лікарського засобу (ЛЗ) у формі емульсії для зовнішнього використання, яка вміщує сухий екстракт плодів пальми сабаль (багатий на фітостероли) та настойку софори японської (джерело флавоноїдів). Фармакологічна активність ЛЗ для дерматологічного застосування в значній мірі залежить від природи основи-носія діючих субстанцій. Тому в статті представлені результати досліджень з розробки складу емульсійної основи. На першому етапі було опрацьовано 16 рецептур емульсійних основ, до складу яких в якості олійної фази вводили олію насіння гарбуза. Як стабілізатори гетерогенної системи використовували комплексні емульгатори та розчини гелеутворювачів (альгілату натрію, ксантанової камеді, карбоксиметилцелюлози, карбополу). Для основ, які були однорідними за зовнішнім виглядом одразу після виготовлення, проводили визначення колоїдо- та термостабільності. Основи, що пройшли випробування, піддали мікроскопічним та біофармацевтичним дослідженням, які дозволили встановити розмір та однорідність часток олійної фази, а також визначити ефективність вивільнення біологічно активних речовин (БАР) з основ-носіїв. На підставі проведених досліджень було встановлено, що оптимальними властивостями володіють основи, які вміщують гелеутворювачі карбопол, альгілат натрію та ксантанову камедь, емульгатори твін-20 і цетиловий спирт.

**РАЗРАБОТКА СОСТАВА ЭМУЛЬСИОННОЙ ОСНОВЫ ПРИ СОЗДАНИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО КОСМЕТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ АНДРОГЕННОЙ АЛОПЕЦИИ  
И.О.Ярема, М.И.Федоровская**

**Ключевые слова:** андрогенная алопеция; эмульсионная основа; эмульгаторы; гелеобразователи; биофармацевтические исследования; микроскопические исследования

Лечение андрогенной алопеции (АА) на сегодняшний день остается сложной задачей трихологии и косметологии, поскольку ассортимент лекарственных препаратов (ЛП), которые бы влияли на патогенетическое звено заболевания и были удобными и безопасными в применении, ограничен. Ввиду этого повышенное внимание вызывают субстанции растительного происхождения на основе фитостеролов и флавоноидов. Фитостеролы являются ингибиторами 5- $\alpha$ -редуктазы фермента, отвечающего за возникновение АА, а флавоноиды укрепляют клеточную стенку и улучшают кожное кровообращение. Учитывая вышеизложенное, актуальной является разработка лекарственного средства (ЛС) в форме эмульсии для

наружного применения, которая содержит сухой экстракт плодов пальмы сабаль (богат на фитостеролы) и настойку софоры японской (источник флавоноидов). Фармакологическая активность ЛС для дерматологического применения в значительной степени зависит от природы основы-носителя действующих субстанций. Поэтому в статье представлены результаты исследований по разработке состава эмульсионной основы. На первом этапе было отработано 16 рецептур эмульсионных основ, в состав которых в качестве масляной фазы вводили масло семян тыквы. В качестве стабилизаторов гетерогенной системы использовали комплексные эмульгаторы и растворы гелеобразователя (альгината натрия, ксантановой камеди, карбоксиметилцеллюлозы, карбопол). Для основ, однородных по внешнему виду сразу после изготовления, проводили определение коллоидо- и термостабильности. Основы, прошедшие испытания, подвергли микроскопическим и биофармацевтическим исследованиям, которые позволили установить размер и однородность частиц масляной фазы, а также определить эффективность высвобождения биологически активных веществ (БАВ) из основ-носителей. На основании проведенных исследований было установлено, что оптимальными свойствами обладают основы, содержащие гелеобразователи карбопол, альгинат натрия и ксантановую камедь, эмульгаторы твин-20 и цетиловый спирт.

Рекомендована д.ф.н., професором Т.Г.Ярних

УДК 615.454.1:616-001.4

## ОБГРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ОСНОВИ З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ М'ЯКОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ

В.В.Шматенко

Українська військово-медична академія

*Ключові слова: осмотична активність; основа-носії; гідрофільні неводні розчинники; рановий процес; лікарський засіб; м'яка лікарська форма*

### **SUBSTANTIATION OF THE BASE COMPOSITION WITH THE PURPOSE OF CREATION OF A SOFT DOSAGE FORM FOR TREATING A WOUND PROCESS**

**V.V.Shmatenko**

**Key words:** osmotic activity; base carrier; hydrophilic non-aqueous solvents; wound process; medicine; soft dosage form

*During development of a semisolid medicinal product for the treatment of pyoinflammatory processes a special attention is paid to selection of an ointment base. The modern manufacturing of soft dosage forms for treating pyoinflammatory processes gives advantage to medicines on the hydrophilic base, which can be applied on a wound surface without disturbing perspiration. The absence of domestic medicines for treating a wound process when transferring from stage 1 to stage 2 makes particularly topical a research in developing new combined ointments for treating a wound process. One of the most important indicators of the specific action of a medicine for treating a wound process is the osmotic activity, which is involved in dehydration of a microbial cell and leads to a significant reduction of the biological activity and resistance of microbes. The osmotic activity of the samples of the ointment bases has been studied in vitro by the method of dialysis through a semi-permeable membrane in order to substantiate the optimal ointment base carrier and develop an ointment with the antibacterial and anti-inflammatory action. It has been experimentally found that the base containing the alloy of PEO-400 and PEO-1500 has the best dehydrating properties. When creating ointments for treating a wound process in transferring from stage 1 to stage 2 it should be taken into account that the most optimal are combined bases with a high effect of active medicinal substances release that intensifies their stimulating effect, as well as bases with the ability to create a moderate level of dehydration. Therefore, during the experiment in order to create a combined emulsion ointment base the following emulsifiers have been chosen – MSG and cetostearyl alcohol in the amount of 3% and 5%, respectively. Vaseline oil – 20% has been used as an oil phase (the aqueous phase is purified water – up to 100 %). Based on the osmotic research conducted the composition of the emulsion base for the ointment has been substantiated; it contains: PEO-400 – 4%, PEO-1500 – 1%, MSG – 3%, cetostearyl alcohol – 5%, glycerol – 5%, vaseline oil – 20%, purified water – up to 100%.*

Фармацевтична практика, використовуючи теоретичні і практичні досягнення загальнобіологічних, медичних і технічних наук, дозволяє з нових позицій підійти до вирішення проблеми підвищення ефективності медикаментозного лікування ран. Теоретичною основою такого роду розробок є доведений факт принципової єдності біологічних законів загоєння рани незалежно від її генезу (опікова, травматична або інфекційна) і локалізації (внутрішніх органів або зовнішніх покривів) [1, 4].

Незалежно від виду рани і масштабу втрати тканин загоєння будь-якої рани включає певні фази, які перекриваються за часом і не можуть бути різко розмежовані. При поділі на фази слід враховувати основні морфологічні зміни в ході процесу репарації [9].

Для лікування місцевих інфекційно-запальних захворювань широко застосовуються м'які лікарські форми вітчизняного та закордонного виробництва [7]. Ці препарати по багатьох показниках не відповідають

сучасним медико-біологічним вимогам. Так, вони виготовлені в основному на двох типах мазевих основ: водорозчинних (сплави поліетиленоксидів) та емульсійних [5]. Емульсійні основи не здатні адсорбувати в достатній мірі гнійне виділення рани, а поліетиленоксидні [10] основи через однонаправленість осмотичних процесів призводять до осмотичного шоку клітин грануляційної тканини та слизових оболонок. У клінічній практиці це проявляється у вигляді загибелі грануляційної тканини, місцевої подразнюючої дії, больового синдрому і т. п. [4].

Проведені дослідження осмотичної активності зразків мазевих основ та модельних емульсій, позбавлених вищезазначених недоліків, з метою розробки на цій основі комбінованої мазі антибактеріальної та протизапальної дії.

#### **Матеріали та методи**

Осмотичну активність вивчали при температурі  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  у дослідях in vitro методом діалізу через

Таблиця 1

## Склад модельних мазевих основ

№ основи	Тип маzewої основи	Допоміжні речовини	Вміст речовин
1	Емульсійна типу МВ (ХНІХФІ)	Масло вазелінове Твін-80 Спирт цетостерилловий ПЕО-400 Вода очищена	25,0 5,0 25,0 12,0 до 100,0
2	Емульсійна типу МВ	Масло вазелінове ПЕО-400 Емульгатор №1 Вода очищена	10,0 10,0 8,0 72,0
3	Гідрофільна	ПЕО-400 ПЕО-1500	80,0 20,0
4	Гідрофільна	Аеросил Вода очищена Пропіленгліколь	10,0 45,0 45,0
5	Гідрофільна	Вода очищена Гліцерин НаКМЦ	85,0 10,0 5,0
6	Гідрофільна	МСГ Вода очищена Пропіленгліколь	10,0 45,0 45,0

напівпроникну мембрану [2, 3]. Наважка мазевих основ складала 10,0 г, напівпроникна мембрана – знежирена кишка. Вимірювання маси внутрішніх циліндрів проводили через 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24 год на аналітичних вагах (АДВ – 200М) із точністю до 0,001 г, попередньо витираючи їх із зовнішнього боку. Як середовище для діалізу використовували воду. Кількість рідини, що поглинає мацева основа, виражали у відсотках до маси зразка, який досліджувався (10,0 г). Випробування проводили при температурі  $34,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$  за допомогою термостату ТС-80 М-2. Періодично об'єм води очищеної у діалізній камері доводили до початкового рівня. За різницю маси між двома зважуваннями визначали кількість рідини, що поглиналася.

**Результати та їх обговорення**

Останніми роками намітилася тенденція до більш оптимального використання мазей, враховуючи не тільки їх фармакотерапевтичні характеристики, але

й інші показники: тип носія, рН, дисперсність, осмотичні властивості тощо. Враховуючи медико-біологічні вимоги, що висуваються до мазевих основ, вони повинні володіти достатньою осмотичною активністю. У цих випадках осмотична дія мазевих основ є лікувальним чинником, який забезпечує необхідні умови для загоєння пошкодженої поверхні тканин та посилює протизапальну активність ЛЗ [1]. Вважається, що прояв помірної осмотичної активності препаратами протизапальної дії сприяє дегідратації в зоні запалення, що призводить до зменшення набряку і прискорює обмінні процеси в тканинах.

Тому з метою вибору носія мазі, що розробляється, а також її базових компонентів нами були досліджені осмотичні властивості зразків мазевих основ, які були визначені на основі аналізу літератури [1, 6].

Склад модельних мазевих основ наведений в табл. 1.

Отримані дані наведені на рис. 1 у вигляді кривих залежності поглинання рідини від часу діалізу.

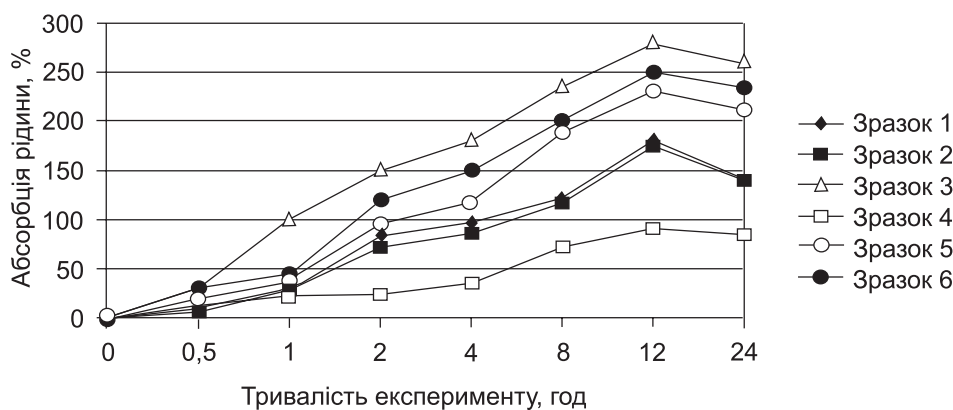


Рис. 1. Осмотична активність модельних зразків.

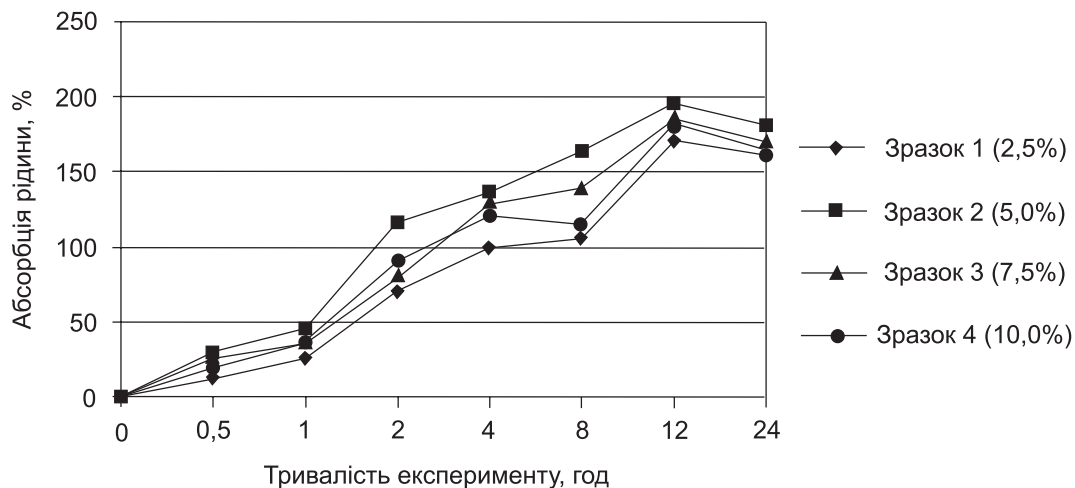


Рис. 2. Осмотичні властивості модельної емульсійної мазевої основи в залежності від концентрації гліцерину.

Скринінг даних показує, що модельні зразки мазевих основ протягом 24 год проявляють виражену осмотичну активність.

Так, через 12 год найбільшу осмотичну активність –  $280 \pm 1,5\%$  мав зразок мазевої основи №3, виготовлений на поліетиленоксидній основі. Така висока осмотична активність чинитиме сприятливу дію на очищення гнійного ексудату рани.

В експерименті на 12 год найменший осмотичний ефект проявив зразок №4 –  $90 \pm 2,4\%$ . Враховуючи невелику осмотичну активність цього зразка, цю основу недоцільно використовувати з метою створення мазей для лікування ранового процесу при переході першої фази в другу.

Проведені дослідження показали, що мазеві основи №1 та №2 показують схожі осмотичні властивості ( $180,0 \pm 3,5\%$ ;  $175,2 \pm 4,3\%$  відповідно).

Помірно вищі осмотичні властивості показали зразки мазевих основ №5 та №6 ( $230,3 \pm 2,4\%$ ;  $250,2 \pm 3,6\%$  відповідно).

Тому для подальших досліджень вибрана основа №3, яка містить сплав ПЕО-400 і ПЕО-1500.

Відомо, що найбільшу стабільність, високу дисперсність та необхідні в'язко-пластичні властивості емульсії забезпечує використання сумішей емульгаторів першого та другого роду у певних співвідношеннях, що визначає важливу інформацію про міжфазну функцію поверхнево-активних речовин [1, 3].

Важливим моментом, що визначає властивості емульсії, є надмолекулярна структура агрегатів, утворених емульгаторами [2, 6]. Дослідження в цьому напрямі актуальні, оскільки на підставі їх результатів можна управляти як фізико-хімічними, так і біофармацевтичними властивостями МЛЗ: вивільненням і біодоступністю лікарських речовин, осмотичною активністю, нешкідливістю та ін. [3].

При виборі емульгатора враховувалась не тільки його здатність утворювати стабільні емульсії з відповідними консистентними властивостями, але й необхідність забезпечити легке змішування мазі з серозними виділеннями та гнійним ексудатом.

Таблиця 2

Мазеві основи в залежності від концентрації гліцерину

Назва	Модельні зразки			
	1	2	3	4
Гліцерин	2,5	5,0	7,5	10,0

З цією метою на основі маркетингових досліджень фармацевтичного ринку було обґрунтовано вибір емульгаторів – МСГ та спирту цетостерилового. Концентрація МСГ склала 3%, а спирту цетостерилового – 5%, що обґрунтовано попередніми дослідженнями [1, 8].

Як олійну фазу використовували масло вазелінове – 20% (водна фаза – вода очищена – до 100%). При такій кількості масла вдається отримати стійку емульсію із задовільними споживчими показниками і в'язко-пластичними характеристиками [8].

Наступним етапом наших досліджень було визначення впливу та концентрації неводних розчинників, зокрема гліцерину, на осмотичні властивості обраної на основі попередніх досліджень модельної мазевої основи (№3). Неводний розчинник вводили до готової емульсії при температурі  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Слід відзначити, що при використанні гліцерину у складі мазевої основи після завершення фази активного осмосу настає фаза «зворотного осмосу». Цей розчинник здатен до пенетруючого ефекту, що дозволяє його молекулам проходити у водне середовище крізь мембрану. Завдяки такій здатності гліцерин сприяє створенню мазевих основ з тривалим, але більш м'яким дегідратуючим ефектом.

З метою обґрунтування кількісного вмісту осмотично активного розчинника в складі мазевої основи нами обрано гліцерин у різних концентраціях (2,5%, 5%, 7,5% та 10%) та проведені дослідження її осмотичної активності. Склад варіабельності концентрацій гліцерину наведено в табл. 2, а склад емульсійної основи обґрунтовано попередніми дослідженнями.

Результати експериментального визначення осмотичної активності модельної мазевої основи в залежності від концентрації гліцерину наведені на рис. 2.

Проведені дослідження показали, що модельні зразки 1, 3 та 4 мають значущі осмотичні властивості через 12 год ( $160,0 \pm 2,7\%$ ;  $170,2 \pm 2,5\%$ ;  $165,2 \pm 2,1\%$  відповідно). Проте зразок №2 значно відрізняється абсорбційною здатністю ( $195,5 \pm 2,7\%$ ). Такий помірний відсоток показника осмотичної активності дозволяє забезпечити видалення гнійних виділень з уражених тканин, проявити протизапальну активність та забезпечити тривалий, але більш м'який дегідратуючий ефект.

Попередніми дослідженнями проф. Л.Л.Давтян [3] осмотична активність МЛЗ умовно була розподілена на малу (до 83%), середню (до 193%) та виражену осмотичну активність (від 240%). Виходячи з вищевикладеного та з результатів дослідження, ми зробили висновок, що опрацьована мазева емульсійна основа має середню осмотичну активність. У нашому випадку це обумовлено як ЛФ, так і допоміжними речовинами.

Таким чином, на підставі проведених осмотичних досліджень нами обґрунтовано склад емульсійної основи для мазі з вмістом гліцерину 5%.

## ВИСНОВКИ

1. На основі дослідів осмотичних властивостей мазевих основ обрано оптимальний носій для мазі – основу на базі ПЕО-1500 та ПЕО-400, осмотичні властивості якої дозволяють забезпечити усунення гнійного виділення.

2. Досліджені осмотичні властивості емульсійних мазевих основ на основі масла вазелінового з різними поверхнево-активними речовинами.

Експериментально встановлено, що помірну дегідратуючу дію серед комбінацій емульгаторів має модельна емульсія яка містить 5,0% спирту цетостерилового та 3,0% моностеарату гліцерину з вмістом допоміжних речовин (масло вазелінове – 20%, гліцерин – 5%, вода очищена – до 100%).

3. Згідно з результатами дослідження *in vitro* встановлено, що запропонована мазева емульсійна основа має середню осмотичну активність.

4. На підставі проведених осмотичних досліджень нами обґрунтовано склад емульсійної основи для мазі: ПЕО-400 – 4%, ПЕО-1500 – 1%, МСГ – 3%, спирту цетостерилового – 5%, гліцерину – 5%, масла вазелінового – 20%, води очищеної – до 100%.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Воловик Н.В., Ляпунов Н.А. // *Фармаком.* – 2001. – №2. – С. 1-10.
2. Гладух Є.В. // *Вісник фармації.* – 2002. – №4 (32). – С. 38-41.
3. Давтян Л.Л. // *Фармац. журн.* – 2003. – №3. – С. 74-77.
4. *Допоміжні речовини та їх застосування в технології лікарських форм: довідковий посібник / Ф.Жогло, В.Возняк, В.Попович та ін.* – Львів: Центр Європи, 1996. – 95 с.
5. Перцев И.М., Котенко А.М., Чуешов О.В., Халаева Е.Л. *Фармацевтические и биологические аспекты мазей.* – Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003. – 288 с.
6. *Сучасне медикаментозне лікування ран (Відомча інструкція).* – К., 2002. – 35 с.
7. Chren M., Landefeld C.S. // *JAMA.* – 1994. – №22. – P. 1922-1925.
8. Gray J.E., McNamee P.M. // *Sci. Review Series.* – 2000. – Vol. 1. – P. 38-49.
9. Maisch T. // *Lasers in Medical Sci.* – 2007. – Vol. 22, №2. – P. 83-91.
10. Young R., Lovell P. *Introduction to Polymers.* – London: Chapman&Hall, 1996. – 487 с.

## ОБґРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ОСНОВИ З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ М'ЯКОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ

**В.В.Шматенко**

**Ключові слова:** осмотична активність; основа-носій; гідрофільні неводні розчинники; рановий процес; лікарський засіб; м'яка лікарська форма

Особлива увага при створенні лікарських засобів (ЛЗ) для лікування гнійно-запальних процесів приділяється вибору основи. У сучасному виробництві м'яких лікарських форм для лікування гнійно-запальних процесів перевага надається ЛЗ на гідрофільних основах, які можна наносити на ранову поверхню без порушення перспірації. Відсутність вітчизняних препаратів для лікування ранового процесу при переході з першої фази в другу, що сприяють процесам регенерації, надає актуальності пошуку зі створення нових комбінованих мазей для лікування ранового процесу. Одним з важливих показників специфічної дії ЛЗ для лікування ранового процесу є осмотична активність, завдяки якій відбувається зневоднення мікробних клітин, що викликає суттєве зниження біологічної активності і стійкості мікробів. Методом діалізу через напівпроникну мембрану у дослідах *in vitro* нами досліджено осмотичну активність зразків мазевих основ з метою обґрунтування оптимальної основи-носія і розробки на цій основі мазі антибактеріальної та протизапальної дії. Експериментально встановлено, що найкращими дегідратуючими властивостями володіє основа, яка містить сплав ПЕО-400 і ПЕО-1500. При створенні мазей для здійснення лікування у рановому процесі під час переходу його від першої до другої фази слід враховувати, що більш оптимальними слід вважати

комбіновані основи, які забезпечують високий ефект вивільнення лікарських субстанцій, що посилює їх стимулюючу дію, а також основи, які створюють в рані помірний рівень дегідратації. Тому в ході експерименту з метою створення комбінованої емульсійної мазевої основи нами обґрунтовано вибір емульгаторів – МСГ та спирт цетостериловий в кількості 3% та 5% відповідно. Як олійну фазу використовували масло вазелінове – 20% (водна фаза – вода очищена – до 100%). На підставі проведених осмотичних досліджень нами обґрунтовано склад емульсійної основи для мазі: ПЕО-400 – 4%, ПЕО-1500 – 1%, МСГ – 3%, спирту цетостеарилового – 5%, гліцерину – 5%, масла вазелінового – 20%, води очищеної – до 100%.

## **ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА ОСНОВЫ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ МЯГКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА**

**В.В.Шматенко**

**Ключевые слова:** осмотическая активность; основа-носитель; гидрофильные неводные растворители; раневой процесс; лекарственное средство; мягкая лекарственная форма. Особое внимание при создании лекарственных средств (ЛС) для лечения гнойно-воспалительных процессов уделяется выбору основе. В современном производстве мягких лекарственных форм для лечения гнойно-воспалительных процессов предпочтение отдается ЛС на гидрофильных основах, которые можно наносить на раневую поверхность без нарушения перспирации. Отсутствие отечественных препаратов для лечения раневого процесса при переходе с первой фазы во вторую, способствующих процессам эпителизации, является актуальным для поиска по созданию новых комбинированных мазей для лечения раневого процесса. Одним из важных показателей специфического действия ЛС для лечения раневого процесса является осмотическая активность, благодаря которой происходит обезвоживание микробных клеток, что вызывает существенное снижение биологической активности и устойчивости микробов. Методом диализа через полупроницаемую мембрану в опытах *in vitro* нами исследована осмотическая активность образцов мазевых основ с целью обоснования оптимальной основы-носителя и разработки на этой основе мази антибактериального и противовоспалительного действия. Экспериментально установлено, что лучшими дегидратирующими свойствами обладает основа, в состав которой входит сплав ПЭО-400 и ПЭО-1500. При создании мазей для лечения раневого процесса при переходе его от первой ко второй фазе следует учесть, что более оптимальными следует считать комбинированные основы, которые обеспечивают высокий эффект высвобождения лекарственных субстанций, что усиливает их стимулирующее действие, а также основы, которые создают в ране умеренный уровень дегидратации. Поэтому в ходе эксперимента с целью создания комбинированной эмульсионной мазевой основы нами обоснован выбор емульгаторов – МСГ и спирт цитостеариловый в количестве 3% и 5% соответственно. Как масляную фазу использовали масло вазелиновое 20% (водная фаза – вода очищенная – до 100%). На основании проведенных осмотических исследований нами обоснован состав эмульсионной основы для мазі: ПЭО-400 – 4%, ПЭО-1500 – 1%, МСГ – 3%, спирта цитостеарилового – 5%, глицерина – 5%, масла вазелинового – 20%, воды очищенной – до 100%.



# СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Recommended by Doctor of Chemistry, professor M.Ye.Blazheyevskiy

UDC 543.257+547.583.5

## THE REACTIVITY OF SUBSTITUTED 6,9-DICHLORACRIDINES

O.M.Sviechnikova, S.V.Kolesnyk, O.V.Kolesnyk

National University of Pharmacy

National Kharkiv Pedagogical University named after G.S.Skovoroda

*Key words:* 6,9-dichloracridine, reactivity; acid-base balance; associated acids; Hammet equation; principle of available energy linearity; donor substituents; acceptor substituents; correlative equations

The constants of ionization  $pK_{BH}^+$  of substituted 6,9-dichloracridines have been determined in the mixed ethanol – water solvent (50 mole percent of ethanol) at the temperature of 25°C by the method of potentiometric titration. It has been shown that these compounds are weak bases ( $pK_{BH}^+$  of the corresponding associated acids is in the range of 3.71-3.95). It has been proven that their basicity depends upon the nature and position of substituents in the heterocycle. Introduction of 9-chlorine substituent to the molecule of acridine leads to significant weakening of basic properties ( $pK_{sub}^+ = 0.82$ ) due to decrease of the electron density on the atom of nitrogen (reactive centre). The appearance of 9-chloracridine of chlorine atoms in the molecule in 2-, 4-positions also decreases basicity of the heterocycle, but approximately 6.5 times less ( $pK_{sub}^+ = 0.13$  (2-Cl),  $pK_{sub}^+ = 0.14$  (4-Cl)). On the contrary, the donor substituents increase basicity. The quantitative assessment of the substituents influence has been performed within the principle of available energy linearity according to the Hammet equation by the correlation analysis method. The equation obtained, which includes  $pK_{BH}^+$  of all experimental compounds, proved to be statistically uncertain. On the plot of  $pK_{BH}^+ - f(\sigma)$  dependence, the value of  $pK_{BH}^+$  for 4-methoxy substituent is supposed to be out of the linear dependence. Elimination from correlation of  $pK_{BH}^+$  for 4-methoxy substituted 6,9-dichloracridine allowed to obtain the correlation equation of  $pK_{BH}^+ - f(\sigma)$  relationship with reliable statistic characteristics. This equation allows to predict reactivity of other members of this homologous series. The low value of the reaction constant is  $\rho = 0.86$  and testifies a slight sensitivity of the reactive centre (heterocyclic atom of nitrogen) to the influence of substituents in the molecule of substituted 6,9-dichloracridine. It is notable that the reactive constants  $\rho$  for 6,9-dichloracridines, 5-nitro-9-chloracridines within the limits of experimental error coincide, and it indicates the single mechanism of the electronic influence of substituents on the reactive centre.

Substituents of 9-chloracridine are widely used as starting substances for obtaining various biologically active 9-amino-, 9-alkylamino-, 9-arylamino-, 9-hydrazineacridines [3-5, 8-12, 16, 18-20]; markers in genetic engineering [6]; luminescent indicators in analytical chemistry [6, 15, 17].

The aim of the research is to study reactivity of substituted 6,9-dichloracridines because the reactivity of compounds of this homologous series has not been investigated in details [5, 12]. Thus, the relevance of the research is beyond a doubt as it allows to optimize the synthesis of these compounds.

The reactivity of this class of compounds has been investigated by the study of the acid-base balance (Scheme).

The ionization constants ( $pK_{sub}^+$ ) of acids associated with substituents of 6,9-dichloracridine in the mixed solvent such as ethanol–water (50 mole percent of ethanol) have been determined by the method of potentiometric titration at the temperature of 25°C (Table).

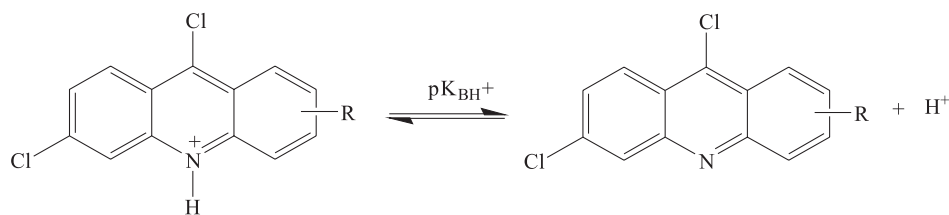
These data testify that substituted 6,9-dichloracridines are weak bases;  $pK_{sub}^+$  of the corresponding as-

sociated acids are in the range of 3.71-3.95. Basicity of substituted 6,9-dichloracridines depends on the nature and position of substituents in the heterocycle. Introduction of 9-chlorine substituent to the molecule of acridine leads to significant weakening of basic properties ( $pK_{sub}^+ = 0.82$ ) [13] due to decrease of the electron density on the atom of nitrogen (reactive centre). The appearance of 9-chloracridine of chlorine atoms in the molecule in 2-, 4-positions also decreases basicity of the heterocycle, but approximately 6.5 times less ( $pK_{sub}^+ = 0.13$  (2-Cl),  $pK_{sub}^+ = 0.14$  (4-Cl)). On the contrary, the donor substituents increase basicity.

The quantitative assessment of the substituents influence has been performed within the principle of available energy linearity according to the Hammet equation by the correlation analysis method. The equation obtained (1) is statistically uncertain because of the low value of the correlation coefficient ( $r$ ):

$$pK_{BH}^+ = (3.85 \pm 0.04) - (0.50 \pm 0.09) \cdot \sigma \quad (1)$$

n=9    r=0.845    s=0.016



1 R=H; 2 R=2-OCH<sub>3</sub>; 3 R=4-OCH<sub>3</sub>; 4 R=2-CH<sub>3</sub>; 5 R=4-CH<sub>3</sub>;  
6 R=2-Cl; 7 R=4-Cl; 8 R=1,3-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 9 R=2,3-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Scheme

On the plot of  $pK_{\text{sub}}^+ - f(\sigma)$  dependence (Fig.) the values of  $pK_{\text{sub}}^+$  for 4-methoxy substituent are out of the linear dependence. The same effect is observed when studying 5-nitro-9-chloracridines [5], 9-thioacridones [10], 9-hydrazineacridines [11]. Probably it is connected with the intramolecular hydrogen bonding between oxygen of 4-methoxy group and heterocyclic nitrogen.

Elimination from correlation of  $pK_{\text{BH}}^+$  for 4-methoxy substituted 6,9-dichloracridine (3) leads to sharp improvement of statistical characteristics:

$$pK_{\text{BH}}^+ = (3.86 \pm 0.02) - (0.86 \pm 0.05) \cdot \sigma \quad (2)$$

$n=8 \quad r=0.989 \quad s=0.016$

The low value of the reaction constant  $\rho = 0.86$  testifies a slight sensitivity of the reactive centre (heterocyclic atom of nitrogen) to the influence of substituents in the molecule of substituted 6,9-dichloracridine. It is interesting to note that reactive constants  $\rho$  for 6,9-di-

chloracridines [5], 5-nitro-9-chloracridines [5] within the limits of experimental error coincide, and it indicates the single mechanism of the electronic influence of substituents on the reactive centre.

#### Experimental Part

The study of the acid-base balance was performed by the method [1]. The titrant was 0.01 M aqueous solution of hydrochloric acid. The concentration of the solutions to be titrated was 0.005 mol/dm<sup>3</sup> in the point of semi-neutralization. Potentiometric titration was performed on an EV-74 ionomer using glass (ESP-43-074) and silver chloride (EVP-1M) electrodes at 25°C. The experiments were carried out in triplicate, and the data obtained were analyzed according to the requirements of the SPhU [2]. The correlative analysis was conducted by methods of mathematic statistics (with the confidence interval of 0.95) [7].

In order to prepare the mixed solvent, the bidistillate free of CO<sub>2</sub> and ethanol were used.

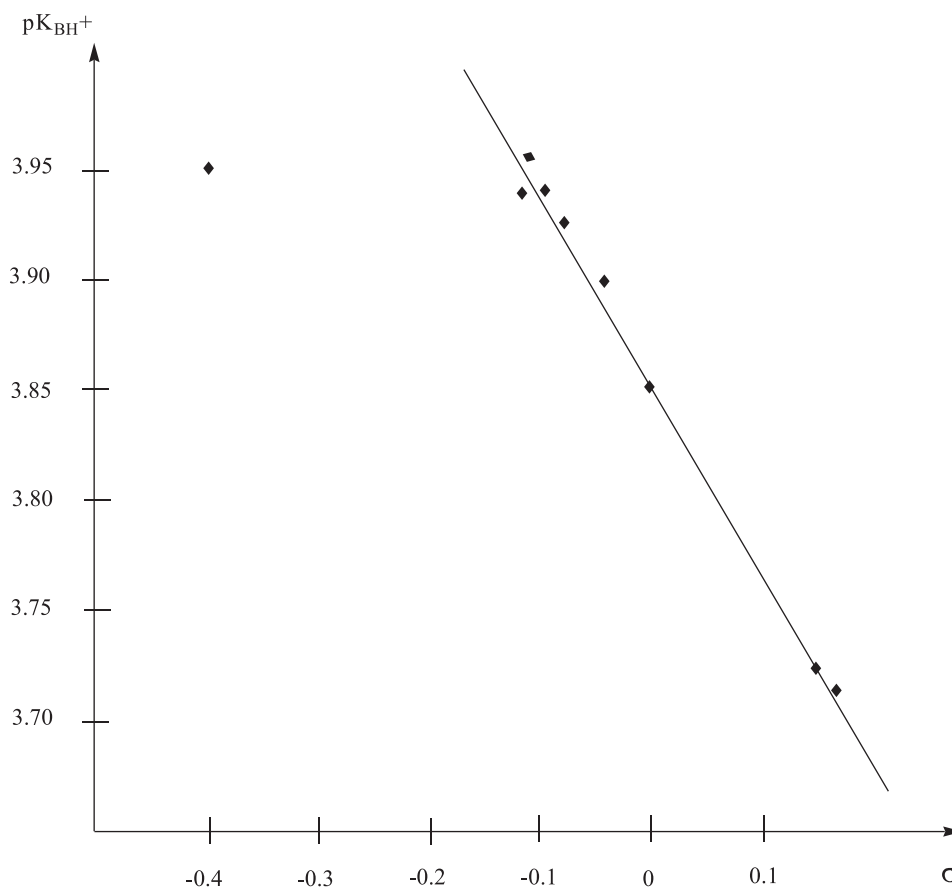


Fig. Dependence of  $pK_{\text{BH}}^+ - f(\sigma)$  for substituted 6,9-dichloracridines (1-9).

Table

Properties of substituted 6,9-dichloracridines (1-9)

Compound	Yield, %	Melting point, °C	Found, %			Molecular formula	Calculated, %			pK <sub>BH</sub> <sup>+</sup>
			N	C	H		N	C	H	
1	96	100-101	5.64	62.90	2.81	C <sub>17</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> N	5.65	62.93	2.84	3.85±0.02
2	93	123-125	5.05	60.42	3.25	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO	5.04	60.46	3.26	3.94±0.04
3	95	119-121	5.03	60.40	3.25	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO	5.04	60.46	3.26	3.95±0.04
4	92	129-132	5.33	64.19	3.45	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> N	5.34	64.15	3.46	3.92±0.01
5	90	127-129	5.35	64.18	3.45	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> N	5.34	64.15	3.46	3.89±0.03
6	94	98-100	4.95	55.21	2.13	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub> N	4.96	55.26	2.14	3.72±0.03
7	93	99-101	4.95	55.22	2.13	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub> N	4.96	55.26	2.14	3.71±0.02
8	91	133-135	5.08	65.20	4.00	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N	5.07	65.24	4.01	3.95±0.03
9	90	137-139	5.06	65.28	4.02	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N	5.07	65.24	4.01	3.94±0.04

The synthesis of substituted 6,9-dichloracridines (1-9) was carried out by the method [14]; their physical and chemical parameters corresponded to the literature data [14].

#### CONCLUSIONS

1. The reactivity of substituted 6,9-dichloracridines has been researched in the reverse conditions by studying the acid-base balances of the corresponding associated acids in the mixed ethanol – water solvent (50 moles percent of ethanol) at 25°C.

2. The influence of the nature and position of substituents in the heterocycle upon the strength of the corresponding associated acids has been analyzed.

3. It has been proven that acceptor substituents weaken basicity of 6,9-dichloracridine, but donor substituents cause the opposite effect.

4. The Hammet correlation equation has been obtained with convincing statistic characteristics; it is used to predict acid-base properties of substituted 6,9-dichloracridines.

#### REFERENCES

1. Альберт А., Серженет Е. Константы ионизации кислот и оснований. – М.: Химия, 1964. – С. 214.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ООО «РИРЕГ», 2001. – 556 с.
3. Исаев С.Г. // Ліки. – 2001. – №3/4. – С. 72-74.
4. Исаев С.Г. // Фармац. журн. – 1999. – №3. – С. 52-54.
5. Исаев С.Г., Свечникова О.М., Павлій О.І. // Вісник фармації. – 2003. – №4 (36). – С. 27-29.
6. Лабораторное руководство по хроматографии и смежным методам / Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 396 с.
7. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул. – М., 1988. – С. 41-49.
8. Мартиновський О.О., Панасенко Т.В., Панасенко О.І. // Вісник фармації. – 1999. – №2 (20). – С. 44-46.
9. Свечникова Е.Н. // ЖОХ. – 1997. – Т. 67. – Вып. 1. – С. 138-140.
10. Свечникова Е.Н. // ЖОХ. – 1998. – Т. 67. – Вып. 6. – С. 1007-1008.
11. Свечникова Е.Н. // ЖОХ. – 1999. – Т. 68. – Вып. 5. – С. 865-866.
12. Свечникова Е.Н. // ЖОХ. – 2001. – Т. 71. – Вып. 5. – С. 848-849.
13. Таблицы констант скорости и равновесия гетероциклических органических реакций. – М.: ВИНТИ, 1975. – С. 846.
14. Chabbit J.J., Galy A.M., Gal J.P. // J. Chem. Engl. Data. – 1989. – Vol. 34, №1. – P. 136-138.
15. Cholewinski G., Dzierzbica K., Kodziejczyk A. // Pharmacol. Reports. – 2011. – Vol. 63. – P. 305-338.
16. Denny W.A., Baguley B.C., Cain B.F. et al. Molecular Aspects of Anticancer Drug Action / Ed. by S. Neidle and M.J. Waring. – London, 1983. – P. 211-234.
17. Dheyongera J.P., Geldenhuys W.J., Dekker T.G. et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2005. – Vol. 13, Issue 3. – P. 689-698.
18. Parajuli R., Medhi C. // J. Chem. Sci. – 2004. – Vol. 116, №4. – P. 235-241.
19. Sebestik J., Stibor I., Hlavacek K. // J. Pept. Sci. – 2006. – №12. – P. 427-478.
20. Zavada Z., Sebestik J., Safarik M. et al. // Eur. J. Org. Chem. – 2011. – Vol. 2011, Issue 34. – P. 6989-6997.

**РЕАКЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ЗАМІЩЕНИХ 6,9-ДИХЛОРАКРИДИНІВ****О.М.Свєчнікова, С.В.Колісник, О.В.Колісник**

**Ключові слова:** 6,9-дихлоракридин; реакційна здатність; кислотно-основні рівноваги; спряжені кислоти; рівняння Гаммета; принцип лінійності вільних енергій; донорні замісники; акцепторні замісники; кореляційні рівняння

Визначені константи іонізації  $pK_{BH}^+$  заміщених 6,9-дихлоракридину в змішаному розчиннику етанол-вода (50 мольних відсотків етанолу) при 25°C методом потенціометричного титрування. Показано, що ці сполуки – слабкі основи ( $pK_{BH}^+$  відповідних спряжених кислот знаходиться в межах 3,71-3,95). Доведено, що їх основність залежить від природи та положення замісників у гетероциклі. Введення у молекулу акридину 9-хлорзамісника призводить до суттєвого послаблення основних властивостей ( $pK_{BH}^+ = 0,82$ ) через зменшення електронної густини на атомі Нітрогену (реакційний центр). Поява у молекулі 9-хлоракридину атомів хлору у 2-, 4-положеннях також зменшує основність гетероциклу, але приблизно у 6,5 разів менше ( $pK_{BH}^+ = 0,13$  (2-Cl),  $pK_{BH}^+ = 0,14$  (4-Cl)). Донорні замісники навпаки підвищують основність. Кількісна оцінка впливу замісників здійснювалась у межах принципу лінійних енергій за рівнянням Гаммета методом кореляційного аналізу. Одержане рівняння, що містить  $pK_{BH}^+$  всіх досліджуваних сполук виявилось статистично невірогідним. На графіку залежності  $pK_{BH}^+ - f(\sigma)$  значення  $pK_{BH}^+$  4-метоксизаміщеного знаходиться поза лінійної залежності. Виключення з кореляції  $pK_{BH}^+$  для 4-метоксизаміщеного 6,9-дихлоракридину дозволило одержати кореляційне рівняння зв'язку  $pK_{BH}^+ - f(\sigma)$  з надійними статистичними характеристиками. Це рівняння дозволяє прогнозувати реакційну здатність інших членів цього гомологічного ряду. Невелике значення реакційної константи  $\rho = 0,86$  свідчить про невисоку чутливість реакційного центра (гетероциклічного атома Нітрогену) до впливу замісників у молекулі заміщених 6,9-дихлоракридину. Цікаво відзначити, що реакційні константи  $\rho$  для 6,9-дихлоракридинів, 5-нітро-9-хлоракридинів у межах похибки експерименту співпадають, що вказує на єдиний механізм електронного впливу замісників на реакційний центр.

**РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ЗАМЕЩЕННЫХ 6,9-ДИХЛОРАКРИДИНОВ****Е.Н.Свєчнікова, С.В.Колесник, Е.В.Колесник**

**Ключевые слова:** 6,9-дихлоракридин; реакционная способность; кислотно-основные равновесия; сопряженные кислоты; уравнение Гаммета; принцип линейности свободных энергий; донорные заместители; акцепторные заместители; корреляционные уравнения

Определены константы ионизации  $pK_{BH}^+$  замещенных 6,9-дихлоракридина в смешанном растворителе этанол-вода (50 мольных % этанола) при 25°C методом потенциометрического титрования. Показано, что эти соединения – слабые основания ( $pK_{BH}^+$  соответствующих сопряженных кислот находится в пределах 3,71-3,95). Доказано, что их основность зависит от природы и положения заместителей в гетероцикле. Введение в молекулу акридина 9-хлорзаместителя приводит к существенному ослаблению основных свойств ( $pK_{BH}^+ = 0,82$ ) вследствие уменьшения электронной плотности на атоме азота (реакционный центр). Появление в молекуле 9-хлоракридина атомов хлора во 2, 4-положениях также уменьшает основность гетероцикла, но приблизительно в 6,5 раз меньше ( $pK_{BH}^+ = 0,13$  (2-Cl),  $pK_{BH}^+ = 0,14$  (4-Cl)). Донорные заместители наоборот повышают основность. Количественная оценка влияния заместителей проводилась в границах принципа линейных энергий по уравнению Гаммета методом корреляционного анализа. Полученное уравнение, содержащее  $pK_{BH}^+$  всех исследуемых соединений, оказалось статистически недостоверным. На графике зависимости  $pK_{BH}^+ - f(\sigma)$  значение  $pK_{BH}^+$  4-метоксизамещенного 6,9-дихлоракридина позволило получить корреляционное уравнение взаимосвязи  $pK_{BH}^+ - f(\sigma)$  с надежными статистическими характеристиками. Это уравнение позволяет прогнозировать реакционную способность других членов этого гомологического ряда. Небольшое значение реакционной константы  $\rho = 0,86$  свидетельствует о невысокой чувствительности реакционного центра (гетероциклического атома азота) к влиянию заместителей в молекуле замещенных 6,9-дихлоракридина. Интересно отметить, что реакционные константы  $\rho$  для 6,9-дихлоракридинов, 5-нітро-9-хлоракридинов в пределах ошибки эксперимента совпадают, что указывает на единый механизм электронного влияния заместителей на реакционный центр.

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor O.I.Pavliy*

UDC 615:542.951.3/.4:54.057

## **SYNTHESIS, STRUCTURE AND RESEARCH OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METHYL ESTERS OF 6-NITRO-N-PHENILANTHRANILIC ACIDS**

S.G.Isaev, H.O.Yeryomina, T.V.Zhukova, T.M.Kryuchkova, G.P.Zhegunova

National University of Pharmacy

*Key words: synthesis; methyl esters of N-phenylanthranilic acids; pharmacological activity*

*Analysis of scientific and patent literature shows the promising results of searching biologically active compounds among derivatives of aromatic aminoacids. For many years at the Medical Chemistry department of the National University of Pharmacy the research has been conducted in the field of development of synthetic methods and study of physico-chemical and pharmacological properties of aromatic acids, in particular, N-phenylanthranilic acids and products of their transformation in order to search active and harmless medicines. The synthesis of methyl esters of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids has been carried out by Fisher esterification in the absolute methanol medium in the presence of concentrated sulfuric acid. Substituted 6-nitro-N-phenylanthranilic acids have been obtained by Ullmann reaction by the interaction of 6-nitro-2-chlorobenzoic acids with arylamines and by arylation of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids by halogenobenzenes derivatives in the medium of n-amylalcohol, in the medium of dimethylformamide, without a solvent in the presence of copper or CuO. The structure of the compounds has been confirmed by elemental analysis, IR- and NMR-spectroscopy. The purity has been controlled by the method of thin-layer chromatography in methanol-hexane (1:1.5) and ethylacetate-methanol-ammonia (8.5:1:0.5). The computer prognosis of possible types of the biological activity of 9 methyl esters of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids synthesized for the first time has been conducted with the help of PASS programme. It has been found experimentally that the substances synthesized possess the anti-inflammatory, analgesic, diuretic, bacteriostatic, fungistatic and antidiuretic activities. According to the classification by K.K.Sydorov the compounds synthesized when introduced intragastrically belong to low toxic compounds ( $DL_{50}=1200-2500$  mg/kg). Some regularities of the "structure – biological activity – toxicity" relationship have been determined.*

Derivatives of N-phenylanthranilic acids (N-PAA) are used in medicine as nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Some of them have proven to be the most effective by the nonspecific action, and do not cause degradation of glycosaminoglycans and collagen in joints [7, 14, 15]. Long-term studies in the field of the series of N-arylanthranilic acids and their derivatives by researchers have led to the creation of effective medicines (mefenamic acid and its alkali salt, antral, diphtorant), which are widely applied in medical practice as anti-inflammatory, hepatoprotective and antipsoriatic medicines [7, 8]. Data of the research of domestic and foreign scientists indicate that derivatives of N-phenylanthranilic acids have a wide synthetic and pharmacological potential [2-4, 6, 8, 10-15]. These circumstances determined to synthesize methyl esters 6-nitro-N-phenylanthranilic acids and study their biological activity.

Substituted 6-nitro-N-PAA (3) have been obtained by Ullmann reaction by the interaction of 6-nitro-2-chlorobenzoic acid (1) with arylamines (Method 1) and by arylation of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids (2) by halogenobenzenes derivatives (Method 2) in the medium of n-amylalcohol, in the medium of dimethylformamide, without a solvent in the presence of copper or copper (II) oxide [6, 8] (Scheme).

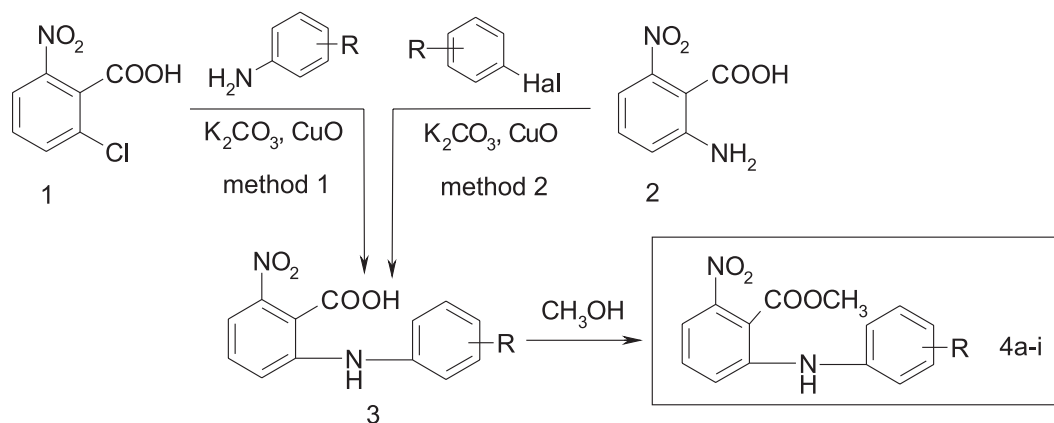
The synthesis of methyl esters of 6-nitro-N-PAA (4a-i) has been carried out by Fisher esterification in the

medium of the absolute methanol in the presence of the concentrated sulfuric acid (Scheme).

The structure and identity of methyl esters of 6-nitro-N-PAA (4a-i) have been confirmed by elemental, IR- and NMR-spectroscopy, chromatographic analysis and qualitative reactions (Tab. 1, 2).

In the NMR-spectra of esters the signals of aromatic protons in the range of 6.59-7.55 ppm have been identified. The proton signal of the secondary amino-group appears as a broad singlet in the region of 7.44-7.64 ppm. The characteristic signal of methyl esters is the signal of COOCH<sub>3</sub>-group, which is registered in the range of 3.95-4.15 ppm (Tab. 2).

IR-spectra of methyl esters of 6-nitro-N-PAA are characterized by a number of intense bands, which correspond to the main structural fragments of molecules of the substances synthesized. In the region of 1728-1698 cm<sup>-1</sup> an intense band corresponding to stretching vibrations of the ester group carbonyl has been interpreted ( $\nu_{C=O}$ ). In the regions of 1282-1270 cm<sup>-1</sup> and 1155-1145 cm<sup>-1</sup> there are stretching vibration bands of C-O-C- ( $\nu_{C-O}^{acid}$ ,  $\nu_{C-O}^{alcohol}$ ), respectively. The first band refers to the stretching vibration of C-O-C – group, to which the main contribution is made by fluctuations of the acidic fragment of the molecule, the main contribution to the second band vibrations is made by the alcoholic fragment of the molecule. Symmetric and asymmetric vibrations of the nit-



Scheme

Table 1

Physical and chemical properties of methyl esters of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids

Compound	R	Yield, %	M.p. <sup>°C</sup> <sup>1</sup>	Found, %			Empirical formula	Calculated, %			Rf <sup>2</sup>	
				C	N	H		C	N	H	1	2
4a	H	81	158-161	61.74	10.32	4.38	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	61.76	10.29	4.44	0.62	0.68
4b	2'-CH <sub>3</sub>	88	152-155	62.91	9.83	5.01	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	62.93	9.79	4.93	0.51	0.60
4c	4'-CH <sub>3</sub>	89	167-169	62.87	9.75	4.88	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	62.93	9.79	4.93	0.48	0.59
4d	3',4'-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	85	182-184	63.92	9.37	5.33	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	62.99	9.33	5.37	0.44	0.50
4e	4'-OCH <sub>3</sub>	84	105-107	59.63	9.34	4.61	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	59.60	9.27	4.67	0.45	0.49
4f	4'-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	85	152-154	60.76	8.91	5.05	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.75	8.86	5.10	0.42	-
4g	4'-OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	77	157-159	61.78	8.54	5.47	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	61.81	8.48	5.49	0.40	-
4h	4'-Cl	79	162-164	54.88	9.15	3.61	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	54.83	9.13	3.65	0.38	0.43
4i	4'-Br	80	170-173	47.85	8.02	3.12	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	47.28	7.98	3.16	0.33	0.39

Notes: <sup>1</sup> Compounds 4a-i were recrystallized from methanol. <sup>2</sup> Rf values are given in the solvent systems: 1 – methanol-hexane (1:1,5); 2 – ethylacetate-methanol-ammonia (8,5:1:0,5).

Table 2

Data of IR- and NMR-spectra of methyl esters of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids

Compound	IR-spectra, absorption maxima, $\nu$ (cm <sup>-1</sup> )								NMR-spectra, chemical shifts, $\delta$ (ppm)				
	$\nu_{NH}$	$\nu_{C=O}^{acid}$	$\nu_{C=O}$	$\nu_{C-O}^{acid}$	$\nu_{C-O}^{alcohol}$	$\nu_{NO_2}^{as}$	$\nu_{C-Ph}$	$\delta_{NH}$	NH (1H, s)	CH <sub>3</sub> (3H, s)	CH <sub>2</sub> (2H, k)	COOCH <sub>3</sub> (3H, s)	Ar H
4a	3340	1685	1705	1280	1152	$\frac{1536}{1350}$	1598	1572	7.62	-	-	4.01	6.88-7.46 (8H, m)
4b	3328	1670	1698	1275	1145	$\frac{1533}{1340}$	1600	1576	7.44	2.08	-	4.05	6.86-7.38 (7H, m)
4c	3338	1675	1720	1272	1148	$\frac{1537}{1352}$	1602	1578	7.55	2.30	-	3.98	6.92-7.45 (7H, m)
4d	3334	1668	1712	1270	1145	$\frac{1535}{1348}$	1596	1570	7.64	2.15 2.25	-	4.15	6.59-7.55 (6H, m)
4e	3344	1682	1722	1278	1156	$\frac{1540}{1357}$	1602	1578	7.56	3.65	-	4.03	6.80-7.40 (7H, m)
4f	3346	1684	1725	1282	1164	$\frac{1528}{1352}$	1604	1582	7.57	1.38	3.44	4.02	6.88-7.44 (7H, m)
4g	3345	1686	1728	1280	1166	$\frac{1530}{1354}$	1605	1584	-	-	-	-	-
4h	3322	1678	1714	1278	1158	$\frac{1538}{1332}$	1600	1575	-	-	-	-	-
4i	3326	1676	1716	1274	1160	$\frac{1534}{1328}$	1598	1576	7.62	-	-	3.95	6.75-7.41 (7H, m)

Table 3

## Pharmacological activities of methyl esters of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids

Compound	Anti-inflammatory, % in the dose of 20 mg/kg	Analgesic, % in the dose of 20 mg/kg	Diuretic, % in the dose of 50 mg/kg (control group 100%)	Bacteriostatic, MIC, µg/ml				Fungistatic, MIC, µg/ml		DL <sub>50</sub> , mg/kg intragastri- cally (in mice)
				<i>Staphylo-ccus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i> , ATCC 6639	<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 97853	<i>Candida albicans</i> , ATCC 653/885	<i>Candida tropicalis</i> Y 2473	
4a	9.8	15.3	108	125	125	125	250	125	500	–
4b	9.2	9.3	82	125	250	125	250	250	125	1200
4c	0	29.4	112	125	250	250	125	125	125	1500
4d	19.5	29.2	140	62.5	125	62.5	250	250	125	1800
4e	14.3	0	72	125	250	125	125	125	125	–
4f	0	15.2	152	125	500	125	125	125	500	–
4g	0	0	201	125	250	125	250	250	250	2000
4h	31.4	33.8	184	31.2	250	31.2	125	125	125	2500
4i	32.3	34.3	162	31.2	250	31.2	125	125	125	2500
Diclofenac (DE <sub>50</sub> =8 mg/kg)	37.5	–	–	–	–	–	–	–	–	360
Mefenamic acid in the dose of 100 mg/kg	30	–	–	–	–	–	–	–	–	628
Metamizole sodium (DE <sub>50</sub> =55 mg/kg)	–	52.0	–	–	–	–	–	–	–	1197
Hydrochlorothiazide in the dose of 50 mg/kg	–	–	212	–	–	–	–	–	–	320
Ethacridine	–	–	–	31.2	15.6	31.2	62.5	–	–	–
Phthalylsulfathiazole	–	–	–	7.8	7.8	250	–	–	–	–
Nitrofuril	–	–	–	–	–	–	–	64	64	–

rogroup in the spectrograms appear in the regions of 1540-1528 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>NO<sub>2</sub></sub>) and 1357-1328 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>NO<sub>2</sub></sub>). Deformation vibrations of NH-group (δ<sub>NH</sub>) are presented in the spectrograms by peak in the region of 1584-1570 cm<sup>-1</sup> (Tab. 2).

Using the PASS programme the analysis of the computer prognosis results shows that 6-nitro-N-PAA (4a-i) methyl esters synthesized for the first time are most likely to reveal the anti-inflammatory, antitumor, diuretic, bacteriostatic, fungistatic activity.

According to Sydorov K.K. classification, methyl esters belong to the class of low toxic substances, their DL<sub>50</sub> with the internal administration in mice is within the range of 1200-2500 mg/kg (Tab. 3). As expected, methyl esters are more toxic than initial acids [6].

Among the esters of 6-nitro-N-PAA (Tab. 3) the strongest diuretic activity is revealed by compound (4g), but it is inferior to hypothiazide. It has been found that the carboxyl group esterification in 6-nitro-N-PAA (4a-i) leads to decrease of the diuretic, analgesic, anti-inflammatory effect and increase of acute toxicity. Compounds (4b, 4e) possess the antidiuretic activity, but they are inferior to adiucreine (65%). The pharmacological screening on the anti-inflammatory and analgesic activity (Tab. 3) in the dose of 20 mg/kg has revealed the substances (4h,

4i) with the anti-exudative effect at the level of mefenamic acid (30%). It should be noted that methyl esters of 6-nitro-N-PAA (4a-i) are less active than initial acids (3). The anti-inflammatory activity of N-PAA esters and their derivatives (4a-i) is shown to be in close connection with their structure; by the anti-exudative action they can be ranged in the following way: D-glucosylammonium salts of N-PAA > acids > methyl esters. The microbiological research shows that the substances synthesized inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* in the concentrations of 31.2-500 µg/ml (Tab. 3). Esters (4h, 4i), which contain covalently bound chlorine and bromine in their structure in the neoanthranilic fragment of the molecule, reveal the most expressed bacteriostatic activity. These substances inhibit *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* more selectively (MIC=31.2 µg/ml). The fungistatic activity of methyl esters of 6-nitro-N-PAA (4a-i) is 31.2-500 µg/ml in relation to *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Compounds (4h, 4i) exceed twice the effect of nitrofuril by their fungistatic activity (Tab. 3) and are less toxic.

#### Experimental Part

IR-spectra of the substances synthesized were measured on a "Specord M-80" spectrophotometer in KBr tab-

lets (with the concentration of 1%). The chromatographic analysis was performed by the method of thin-layer chromatography on "Silufol UV-254" plates produced by "Avalier" firm (Czech Republic); chromatograms were developed by iodine vapours or using UV-radiation. The NMR-spectra were registered on a "Varian M-200" spectrophotometer with the operation frequency of 200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> as a solvent and TMS as an internal standard were used.

**Methyl ester of 6-nitro-N-phenylanthranilic acid (4a).** Heat the mixture of 2.58 g (0.01 mol) of 6-nitro-N-phenylanthranilic acid, 0.75 ml of the concentrated sulfuric acid in 30 ml of absolute methanol with a reflux condenser for 5 hours. After cooling pour the reaction mixture into water and neutralize by sodium hydrocarbonate. Filter the precipitate and dry. The product's yield was 2.20 g (81%). Compounds 4b-i were obtained similarly.

To reveal the anti-inflammatory activity of new compounds their ability to inhibit edema development in acute inflammation caused by carrageenin subplantary injection in the mouse paw was researched [5]. The compounds examined were taken orally as a suspension stabilized by emulsifier Tween-80 in the dose of 20 mg/kg of the animal's body mass. The analgesic action of substances (4a-i) was studied in white rats (weighing 160-200 g) using the acetic acid-induced writhing test in the

dose of 20 mg/kg [5]. The diuretic effect of N-PAA esters (4a-i) was studied by Berkhin Ye.B. method [1]. The substances under research and the reference medicine (hydrochlorothiazide) were injected intraperitoneally 30 min before the water load in the dose of 50 mg/kg (Tab. 3). The study of the bacteriostatic and fungistatic activity of substances (4a-i) *in vitro* was performed by the two-fold serial dilution method in the liquid nutrient medium.

Acute toxicity of the substances synthesized was studied in white mice when introduced intragastrically [5].

The PASS programme was used for computer prognosis of the biochemical activity of 6-nitro-N-PAA methyl esters [10].

#### CONCLUSIONS

1. To search biologically active substances the synthesis of 6-nitro-N-phenylanthranilic acids methyl esters has been done, and their structure and purity has been studied.

2. Using the PASS programme computer prognosis of possible types of the biological activity has been conducted. It has been found experimentally that the substances synthesized possess a moderate anti-inflammatory, analgesic, diuretic, antidiuretic, bacteriostatic and fungistatic antidiuretic activities. Some regularities of the "structure – biological activity – toxicity" relationship among the N-phenylanthranilic acid derivatives have been determined.

#### REFERENCES

1. Берхин Е.Б. // Хим.-фармац. журн. – 1977. – Т. 11, №5. – С. 3-11.
2. Девяткина А.А., Исаев С.Г., Бризицкий А.А., Яременко В.Д. // Матер. 5-й Междунар. науч. конф. «Фарм. образование 2013». – Воронеж, 2013. – С. 279-284.
3. Девяткина А.О., Исаев С.Г., Жегунова Г.П., Яременко В.Д. // Укр. журн. клін. лаб. мед. – 2013. – Т. 8, №1. – С. 238-243.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації. / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
5. Исаев С.Г. Синтез, реакційна здатність і біологічна активність похідних орто-галогенобензойних, ароматичних амінокислот та акридину: дис. ... д-ра фармац. наук: 15.00.02. – Х., 2008. – 357 с.
6. Машиковский В.Д. Лекарственные средства. – 16-е изд., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.
7. Пат. 91422 Україна, МПК С 07 С 229/58, А 61 К 31/196, А 61 Р 29/00, А 61 Р 31/10. 3-Ніпро-N-(3'-нітрофеніл)антранілова кислота, що проявляє протизапальну, анагетичну, діуретичну та протигрибкову активність / С.Г.Исаев, І.А.Зупанець, О.А.Бризицький та ін. – Заявка №200813252. – Заявл.: 17.11.2008. Опубл.: 26.10.2010. – Бюл. №14.
8. Alferova D.O., Gritsenko I.S., Isaev S.G. // Харбашиуци (Kazakhstan). – 2013. – №1 (62). – P. 214-219.
9. Anzali S., Barnickel G., Cezanne B. et al. // J. Med. Chem. – 2001. – №4 (15). – P. 2432-2437.
10. Chikina E.L., Isaev S.G., Svechnikova E.N. / Proceedings of the IVTN – 2004 Computer application in scientific researches IVTN – 2004. – P. 31.
11. Isaev S.G., Svechnikova O.M., Devyatkina A.O., Zhukova T.V. // News of Pharmacy. – 2013. – №4 (76). – P. 15-18.
12. Isaev S.G., Svechnikova O.M., Devyatkina A.O. et al. // News of Pharmacy. – 2013. – №2 (74). – P. 45-48.
13. Gwanyanya A., Macianskiene R., Bito V. et al. // Biochem. and Biophys. Res. Communications. – 2010. – Vol. 402, issue 3. – P. 531-536.
14. Simons L., Caprathe B., Callahan M. et al. // Bioorg. Med. Chemistry Lett. – 2009. – Vol. 19, issue 3. – P. 654-657.



---

**СИНТЕЗ, БУДОВА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ МЕТИЛОВИХ ЕСТЕРІВ 6-НІТРО-N-ФЕНІЛАНТРАНИЛОВИХ КИСЛОТ****С.Г.Ісаєв, Г.О.Єрьоміна, Т.В.Жукова, Т.М.Крючкова, Г.П.Жегунова****Ключові слова:** синтез; метилові естери 6-нітро-N-фенілантранілових кислот; фармакологічна активність

Похідні N-фенілантранілових кислот широко використовуються в медичній практиці. Продовжуючи пошук нових біологічно активних сполук серед похідних антранілової кислоти, ми провели роботу щодо розробки методів синтезу та експериментальних досліджень метилових естерів 6-нітро-N-фенілантранілових кислот для вивчення їх біологічної активності. Синтез метилових естерів 6-нітро-N-фенілантранілових кислот був здійснений на кафедрі медичної хімії НФаУ. Будову 9 синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, ПМР-спектрів. Чистоту контролювали методом тонкошарової хроматографії. Біологічний скринінг нових сполук проведений на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології НФаУ. Встановлено, що синтезовані речовини проявляють протизапальну, анальгетичну, діуретичну, антидіуретичну, бактеріостатичну, фунгістатичну активність. За класифікацією К.К.Сидорова синтезовані естери при внутрішньошлунковому введенні відносяться до класу малотоксичних сполук ( $DL_{50}=1200-2500$  мг/кг). Встановлені деякі закономірності зв'язку «структура – біологічна активність – токсичність».

---

**СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТИЛОВЫХ ЭСТЕРОВ 6-НИТРО-N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ****С.Г.Исаев, А.А.Еремина, Т.В.Жукова, Т.Н.Крючкова, Г.П.Жегунова****Ключевые слова:** синтез; метиловые эстеры 6-нитро-N-фенилантраниловых кислот; фармакологическая активность

Производные N-фенилантраниловых кислот широко используются в медицинской практике. Продолжая поиск новых биологически активных веществ среди производных антраниловой кислоты, мы провели работу по разработке методов синтеза и экспериментального исследования метиловых эфиров 6-нитро-N-фенилантраниловых кислот. Синтез метиловых эфиров 6-нитро-N-фенилантраниловых кислот был осуществлен на кафедре медицинской химии НФаУ. Строение 9 синтезированных веществ подтверждено данными элементного анализа, ИК-, ПМР-спектров. Чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографии. Биологический скрининг новых соединений проведен на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии НФаУ. Установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, анальгетическую, диуретическую, антидиуретическую, бактериостатическую и фунгистатическую активность. По классификации К.К.Сидорова синтезированные эстеры при внутривенном введении относятся к классу малотоксичных соединений ( $DL_{50}=1200-2500$  мг/кг). Выявлены некоторые закономерности связи «структура – биологическая активность – токсичность».

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor V.A.Georgiyants*

UDC 547.544.3:547.831.7

## CHEMICAL MODIFICATIONS OF 6-ALLYLSULFONYL-4-METHYL-1,2-DIHYDROQUINOLIN-2-ONE AS THE APPROACH FOR SEARCHING NEW BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

T.O.Tsapko

National University of Pharmacy

*Key words: 1,2-dihydroquinoline-2-one; allylsulfone; heterocyclic sulfones; nucleophilic addition*

*To search biologically active substances among quinolone-2 sulfonyl derivatives the method for obtaining of the convenient intermediate, namely 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one, has been developed. The synthesis has been carried out by alkylation of the initial 4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfinic acid with allyl bromide in the acetonitrile medium and in the presence of potassium carbonate giving 73% yield of the product. The presence of the allyl fragment of 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one allowed to carry out addition reactions with some C-, N- and O-nucleophiles. Addition to allyl sulfones occurs in accordance with Markovnikov's rule despite of the strong electron withdrawing effect of the sulfonyl group. The reaction of 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one with active methylene compounds has been carried out with diethyl malonate and ethyl cyanoacetate by refluxing in absolute ethanol in the presence of sodium ethoxide. As a result, 2-R-3-methyl-4-(4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfonyl)butanoic acid ethyl esters have been obtained with 73-79% yields. 6-(2-Alkylaminopropylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-ones are formed under the action of N-nucleophilic reagents, in particular primary aliphatic amines, on 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one. This reaction takes place upon heating in dimethylformamide up to 50-60°C for 6 hours, the yields of the products are 35-40%. Hydration of the allyl fragment occurs in the same solvent when treated with sodium hydroxide at 20°C resulting in formation of 6-(2-hydroxypropylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinolin-2-one with 62% yield. The chemical transformations described open a prospect for synthesis of variety of new compounds with different functional groups in the alkylsulfonyl moiety of quinolones. This approach also allows to influence on such properties of new biologically active substances as molecular weight, lipophilicity, acidity, etc., which are essential for permeability of substances through biological membranes.*

According to the recent literature data, most of the studies is devoted to aryl sulfones, while heteryl sulfones have not been investigated so intensively. Nevertheless, some compounds of this class with the antimicrobial [8], antiviral [9, 11], antimalarial [5], anti-inflammatory and analgesic [10, 12, 13], antitumor [6] action have already been found. Therefore, sulfones is a promising class for study in order to develop medicinal substances. Continuing the research of 1,2-dihydroquinoline-2-one derivatives [2] that are carried out in the National University of Pharmacy a number of new potential biologically active substances in the range of 6-sulfonyl derivatives of 4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one have been obtained by the reaction of nucleophilic addition to 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one.

### Materials and Methods

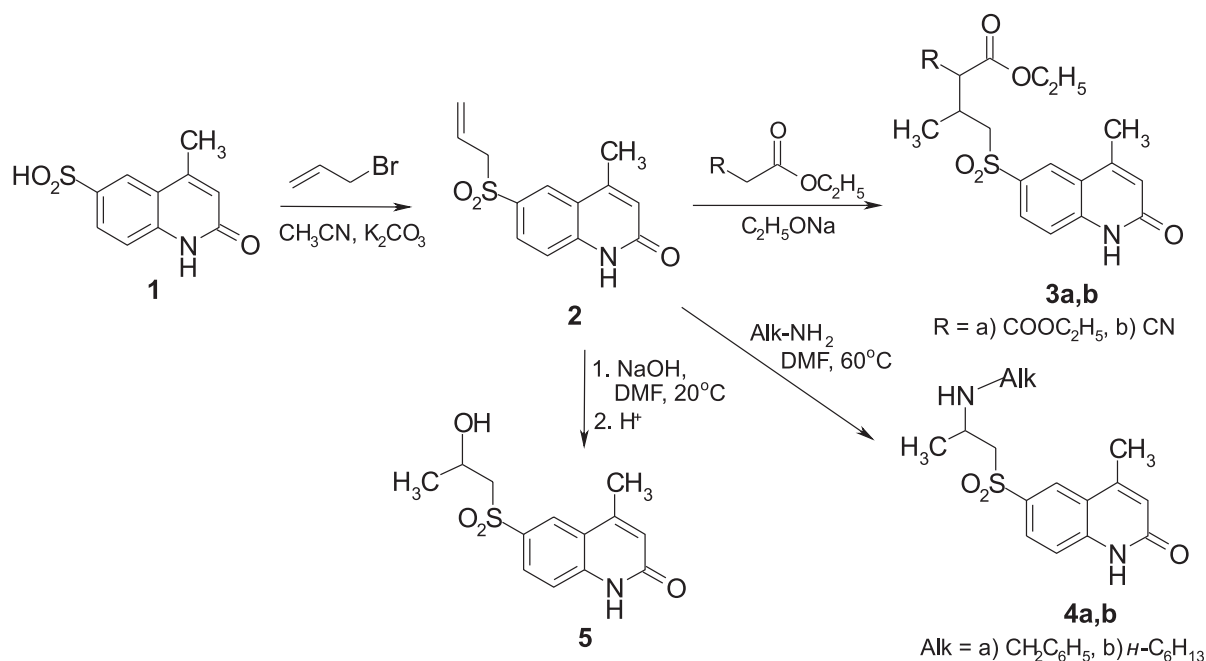
Methods of organic synthesis were used for obtaining new compounds. The structures of the compounds synthesized were proven by the methods of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and mass spectrometry.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on a Varian Mercury VX-200 in DMSO- $\text{D}_6$  solution, the operating frequency was 200 MHz, the internal standard – TMS. Mass spectra were recorded on a Varian 1200L, the ionizing voltage was 70 eV. Melting points were measured by a Koffler device.

### Results and Discussion

The method of synthesis of 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinolin-2-one (**2**) by alkylation of 4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfinic acid (**1**) with allyl bromide has been developed (Scheme 1). The reaction was carried out in acetonitrile medium in the presence of potassium carbonate for 2 h. The product **2** was obtained with the yield of 73% [1].

Compound **2** was used for further chemical modifications due to the presence of the allyl fragment. It is known that despite of the strong electron withdrawing effect of the sulfonyl group addition of nucleophiles to allyl sulfones occurs in accordance with Markovnikov's rule [3]. And the products of this reaction are interesting objects of studying from the pharmacological point of view [4]. Therefore, to continue the search of biologically active compounds in the range of sulfonyl derivatives of 4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one the addition reactions of some nucleophilic reagents to allyl sulfone **2** were carried out. Several active methylene compounds, alkylamines, as well as sodium hydroxide were selected for these reactions (Scheme).

The reactions of 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one (**2**) with diethyl malonate and ethyl cyanoacetate in absolute ethanol in the presence of so-



dium ethoxide for 2h under the reflux were performed. As a result, 2-R-3-methyl-4-(4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfonyl)butanoic acid ethyl esters (**3a,b**) were obtained with high yields (Tab. 1).

6-(2-Alkylaminopropylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-ones (**4a,b**) were synthesized by addition of the primary aliphatic amines to compound **2**. The process was performed in DMFA for 6h when heating up to 50-60°C. The compounds **4a,b** obtained can be considered as promising objects for studying their effects on energy processes in the body because of the fragment of 2-aminoethanesulfonic acid ( $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-SO}_3\text{H}$ ) known as taurine that has diverse physiological effects [5].

As it was shown in our previous work [1], heating of allyl sulfone **2** in aqueous alkaline solutions caused cleavage of the C-S bond. And sodium salt of 4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfinic acid was obtained as the product. Thus, conditions of hydration of the double bond of 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one (**2**) were investigated. It has been found that  $\beta$ -hydroxy derivative, namely 6-(2-hydroxy propylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinolin-2-one (**5**) is formed when

intermediate **2** is treated with sodium hydroxide in DMFA solution at 20°C.

Compounds **3a,b**, **4a,b** and **5** are white crystalline substances, soluble in polar organic solvents, insoluble in water. Data of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and mass spectrometry of the compounds obtained are presented in Tab. 2.

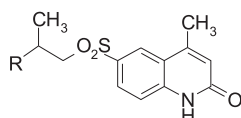
*Synthesis of 2-ethoxycarbonyl-3-methyl-4-(4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-6-sulfonyl)butanoic acid ethyl ester (3a).* Boil 0.01 mole of diethyl malonate for 30 min in sodium ethoxide solution (prepared from 0.23 g of metallic sodium and 20 ml of absolute ethanol). Add 0.01 mole (2.63 g) of allyl sulfone **2** and then boil for 2 hours. Evaporate the solvent under vacuum. Add 50 ml of water, and acidify the mixture with hydrochloric acid to pH=5. Filter the precipitate, crystallize with 50% ethanol.

*2-Cyano-3-methyl-4-(4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfonyl)butanoic acid ethyl esters (3b)* was prepared similarly to compound **3a** using ethyl cyanoacetate instead of diethyl malonate.

*Synthesis of 6-(2-hexylaminopropylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinolin-2-one (4a).* Heat 0.01 mole

Table 1

Properties of the compounds synthesized



Compound	R	Formula	m.p., °C	Yield, %
3a	$\text{CH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$	$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_7\text{S}$	184-186	79
3b	$\text{CH}(\text{CN})\text{COOC}_2\text{H}_5$	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	197-198	73
4a	$\text{NH-(}n\text{-C}_6\text{H}_{13}\text{)}$	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	200-220	35
4b	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	241-243	40
5	OH	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$	198-200	62

Table 2

<sup>1</sup>H NMR spectroscopy and mass spectrometry data of the compounds synthesized

Compound	<sup>1</sup> H NMR spectrum, $\delta$ , ppm										[M <sup>+</sup> ]
	1-NH (1H, s)	H <sub>quin.</sub>				4-CH <sub>3</sub> (3H, s)	CH <sub>2</sub> (2H, d)	CH (1H, m)	CH <sub>3</sub> (3H, d)	R	
		5-H (1H, d)	7-H (1H, dd)	8-H (1H, d)	3-H (1H, s)						
3a	12.04	8.11	7.94	7.46	6.53	2.47	3.37	2.50-2.60	1.08-1.12*	4.05 (4H, q, 2CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 3.61 (1H, d, CH(COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ); 1.08-1.12*	423
3b	12.03	8.16	7.96	7.47	6.54	2.48	3.45	2.55-2.61	1.22	4.40 (1H, d, CHCN); 4.15 (2H, q, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 1.03 (3H, t, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	376
4a	11.96	8.11	7.94	7.42	6.52	2.50	2.28	3.40-3.44	3.20	2.80-2.96 (1H, m, CH-NH); 0.94-1.26 (10H, m, C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> CH <sub>3</sub> ); 0.83 (3H, t, C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> CH <sub>3</sub> )	370
4b	11.98	8.11	7.85	7.41	6.51	2.49	2.31	3.40-3.44	3.22	6.97-7.16 (5H, m, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ); 2.80-2.93 (1H, m, CH-NH); 1.14 (2H, d, CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	364
5	11.98	7.90	7.70	7.34	6.49	2.46	2.87	3.60-3.81	1.10	**	281

\* – 1.08-1.12 ppm multiplet has integrated intensity 9H and contains protons of CH<sub>3</sub> groups of two ethyls and one propyl;

\*\* – proton of the OH group is in deuterium exchange with water of the solvent.

(2.63 g) of allylsulfone **2** and 0.025 mole of *n*-hexylamine in 5 ml of DMFA with stirring at 50-60°C for 6 h. Add 50 ml of water, and acidify the mixture with hydrochloric acid to pH=7, then extract with ether. Evaporate the solvent; crystallize the precipitate with ethanol.

6-(2-Benzylaminopropylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinolin-2-one (**4b**) was prepared similarly to compound **4a** using benzylamine instead of *n*-hexylamine.

Synthesis of 6-(2-hydroxypropylsulfonyl)-4-methyl-1,2-dihydroquinolin-2-one (**5**). Dissolve 0.01 mole (2.63 g) of allylsulfone **2** in 5 ml of DMFA when heating. Add 0.012 mole (0.48 g) of sodium hydroxide. Stir the mixture for 30 min at 20°C, acidify with hydrochloric acid to pH=5-7 and dilute with water. Filter the precipitate formed. Crystallize the product with 50% ethanol adding 1-2 drops of diluted hydrochloric acid.

## CONCLUSIONS

1. The preparative method of alkylation of 4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-6-sulfinic acid with allyl bromide has been developed and 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one has been synthesized.

2. To obtain new biologically active substances in the range of sulfonyl derivatives of quinolone-2 the conditions of the reactions of 6-allylsulfonyl-4-methyl-1,2-dihydroquinoline-2-one with some of C-, N- and O-nucleophilic reagents have been investigated and the corresponding products of addition to the allyl fragment have been obtained.

3. The chemical transformations described can be considered as a convenient way to modify and diversify sulfonyl derivatives of 1,2-dihydroquinoline-2-one.

## REFERENCES

1. Зубков В.О., Гриценко І.С., Цапко Т.О. // ЖОФХ. – 2009. – Т. 7, вип. 3 (27). – С. 30-34.
2. Зубков В.А., Цапко Т.А., Гриценко І.С., Малоштан Л.Н. // ИзвАН. Серия хим. – 2010. – №12. – С. 2272-2275.
3. Получение и свойства органических соединений серы / Под ред. Л.И.Беленького. – М.: Химия, 1998. – 560 с.
4. Прилежаева Е.Н. // Успехи химии. – 2000. – Т. 69, №5. – С. 403-446.
5. Amewu R., Gibbons P., Mukhtar A., Stachulski A.V. et al. // Org. Biomolec. Chem. – 2010. – №8 (9). – P. 2068-2077.
6. Cohen A., Crozet M.D., Rathelot P. // Molecules. – 2012. – Vol. 21, №18 (1). – P. 97-113.
7. Oja S., Saransaari P. // Proc. West. Pharmacol. Soc. – 2007. – Vol. 50. – P. 8-15.
8. Padmavathi V., Thriveni P., Sudhakar Reddy G., Deepti D. // Eur. J. Med. Chem. – 2008. – Vol. 43, №5. – P. 917-924.
9. Samuele A., Kataropoulou A., Viola M., Zanoli S. et al. // Antiviral Res. – 2009. – Vol. 81, №1. – P. 47-55.
10. Shaaban M.R., Saleh T.S., Mayhoub A.S., Mansour A. et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2008. – Vol. 16, №12. – P. 6344-6352.
11. Silvestri R., De Martino G., La Regina G. et al. // J. Med. Chem. – 2005. – Vol. 46, №12. – P. 2482-2493.

12. Tozkoparan B., Küpeli E., Yeşilada E., Ertan M. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 15, №4. – P. 1808-1814.
13. Verbist B., Cleyn M., Surkyn M., Fraiponts E. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18, №8. – P. 2574-2579.

---

#### **ХІМІЧНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ НА ОСНОВІ 6-АЛІЛСУЛЬФОНІЛ-4-МЕТИЛ-1,2-ДИГІДРОХІНОЛІН-2-ОНУ З МЕТОЮ ПОШУКУ НОВИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

**Т.О.Цапко**

**Ключові слова:** 1,2-дигідрохінолін-2-он; алілсульфон; гетероциклічні сульфони; нуклеофільне приєднання

З метою пошуку нових біологічно активних речовин серед сульфонільних похідних хінолону-2 нами було розроблено методику одержання зручного інтермедіату – 6-алілсульфоніл-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-ону. Синтез здійснено шляхом алкілування вихідної 4-метил-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-6-сульфінової кислоти алілбромідом у середовищі ацетонітрилу за присутності поташу з виходом цільового продукту 73%. Наявність алільного фрагменту в одержаному 6-алілсульфоніл-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-оні дозволила провести реакції приєднання деяких С-, N- та O-нуклеофілів. Незважаючи на сильний електроноакцепторний вплив сульфонільної групи приєднання по подвійному зв'язку алілсульфону відбувається за правилом Марковнікова. Взаємодію 6-алілсульфоніл-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-ону з метиленактивними сполуками проводили на прикладі таких речовин як діетиловий естер малонової кислоти та етиловий естер ціанооцтової кислоти при кип'ятінні в абсолютному етанолі в присутності натрію етилату, отримавши етилові естери 2-R-3-метил-4-(4-метил-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-6-сульфоніл)бутанової кислоти з виходами 73-79%. При дії на 6-алілсульфоніл-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-он N-нуклеофільних реагентів, зокрема первинних аліфатичних амінів, утворюються 6-(2-алкіламінопропілсульфоніл)-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-они. Дана реакція перебігає при нагріванні у диметилформаміді до 50-60°C протягом 6 год, виходи продуктів складають 35-40%. Гідратація алільного фрагменту при дії натрію гідроксиду перебігала в тому самому розчиннику при 20°C з утворенням 6-(2-гідроксипропілсульфоніл)-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-ону з виходом 62%. Зазначені напрямки модифікації відкривають перспективу для створення широких рядів нових сполук з різноманітними функціональними групами в алкілсульфонільному фрагменті хінолону. Такий підхід також дозволяє впливати на такі властивості нових БАВ, як молекулярна маса, ліпофільність, кислотність тощо, що має важливе значення для проникності речовин крізь біологічні мембрани.

---

#### **ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ НА ОСНОВЕ 6-АЛЛИЛСУЛЬФОНИЛ-4-МЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-2-ОНА С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

**Т.А.Цапко**

**Ключевые слова:** 1,2-дигидрохинолин-2-он; аллилсульфон; гетероциклические сульфоны; нуклеофильное присоединение

Для поиска новых биологически активных веществ среди сульфонильных производных хинолона-2 нами была разработана методика получения удобного интермедиаата – 6-аллилсульфонил-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-она. Синтез осуществлен путем алкилирования исходной 4-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-сульфиновой кислоты аллилбромидом в среде ацетонитрила и в присутствии поташа с выходом целевого продукта 73%. Наличие аллильного фрагмента в полученном 6-аллилсульфонил-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-оне позволило провести реакции присоединения некоторых С-, N- и O-нуклеофилов. Несмотря на сильное электроноакцепторное влияние сульфонильной группы присоединение по двойной связи аллилсульфона происходит по правилу Марковникова. Взаимодействие 6-аллилсульфонил-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-она с метиленактивными соединениями проводили на примере таких веществ, как диэтиловый эфир малоновой кислоты и этиловый эфир цианоксусной кислоты при кипячении в абсолютном этаноле в присутствии натрия этилата, получив этиловые эфиры 2-R-3-метил-4-(4-метил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-6-сульфонил)бутановой кислоты с выходами 73-79%. При действии на 6-аллилсульфонил-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-он N-нуклеофильных реагентов, в частности первичных алифатических аминов, образуются 6-(2-алкиламинопропилсульфонил)-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-оны. Данная реакция проходит при нагревании в диметилформамиде до 50-60°C в течение 6 часов, выходы продуктов составляют 35-40%. Гидратация аллильного фрагмента при действии натрия гидроксида протекала в том же растворителе при 20°C с образованием 6-(2-гидроксипропилсульфонил)-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-она с выходом 62%. Указанные направления модификации открывают перспективу для создания широких рядов новых соединений с различными функциональными группами в алкилсульфонильном фрагменте хинолонов. Данный подход также позволяет влиять на такие свойства новых БАВ, как молекулярная масса, липофильность, кислотность и т. д., что имеет важное значение для проницаемости веществ через биологические мембраны.

*Recommended by Doctor of Chemistry, professor M.Ye.Blazheyevskiy*

UDC 542.91.1: 547.272: 547.756: 542.951.3

## SYNTHESIS AND PROPERTIES OF N-[2-(BENZOYLAMINO)(2-OXOINDOLIN-3-YLIDENE)ACETYL]AMINO ACIDS ETHYL ESTERS

O.O.Altukhov

National University of Pharmacy

*Key words: synthesis; derivatives of 2-(benzoylamino)(1-R-2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene) acetic acids; azlactone; amino acids; ethyl esters*

*Analysis of scientific and patent literature testifies that search of biologically active compounds among derivatives of 2-oxoindoline is prospective. They include well-known amino acids (tryptophane), neurohormone serotonin, a number of natural alkaloids and synthetic drugs (indomethacin, dimecarbin). For many years at the Analytical chemistry department of the National University of Pharmacy the extensive studies have been conducted in the field of development of synthetic methods and the study of physicochemical and biological characteristics of hetarylcarboxylic acids, in particular, 2-oxoindolinacetic acids and products of their transformation in order to search active and harmless medicines. The pharmacological research of (2-oxoindolin-3-ylidene)-2-oxoacetic acid derivatives allow making a conclusion that the highest nootropic activity is shown by substances containing amino acid esters moieties. Extending directions of the target-based search for biologically active compounds and basing on the previous studies it has been decided to include the fragments of amino acids into the core structure – 2-(benzoylamino)(2-oxoindolin-3-ylidene)-2-oxoacetic acid and to carry out the synthesis of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acids ethyl esters. The structure of the compounds synthesized has been confirmed by the data of elemental analysis, IR- and <sup>1</sup>H NMR-spectroscopy. In <sup>1</sup>H NMR spectrum of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine the signal of the methylene group of the amino acid residue is observed as a duplet at δ 4.0 ppm. The signal of the carboxyl group proton in the spectrum of the acid is not observed as a result of deuterium exchange. The signal of CH<sub>2</sub>-group is shifted downfield (4.08 ppm) for the ester. The signals of the ethoxy group are recognized as a quartet at 4.20 ppm (2H, CH<sub>2</sub>) and a triplet at 1.21 ppm (3H, CH<sub>3</sub>).*

In Ukraine, as well as in the most countries all over the world, a cerebral stroke is one of the most frequent causes of disability and death rate. According to the research data there are 600 patients with the consequences of stroke per each 100 thousand of the population; 60% of them remain invalids. At the same time an active rehabilitation allows to decrease the degree of disability for patients that overcome the cerebral stroke and to turn them back to work.

Due to the fact that the native nootropic drugs nomenclature is significantly less than the nomenclature of this group of drugs available at foreign markets, and which is very often insufficient for necessities of medical practice satisfaction, the search of new nootropic drugs is an urgent task. Taking into consideration the reference sources the interest for chemistry of 2-oxoindolinacetic acids is conditioned by a significant biological activity of their derivatives [12, 14-16].

Lately the attempts of modification of different compounds by amino acids, which have a wide spectrum of the pharmacological activity and provide harmless and easily digestible form to other substances, are performed. In many cases they have the potentiating effect [17-20]. In addition, amino acids participate in the processes of nervous, vascular and other types of regulation of the body's functions.

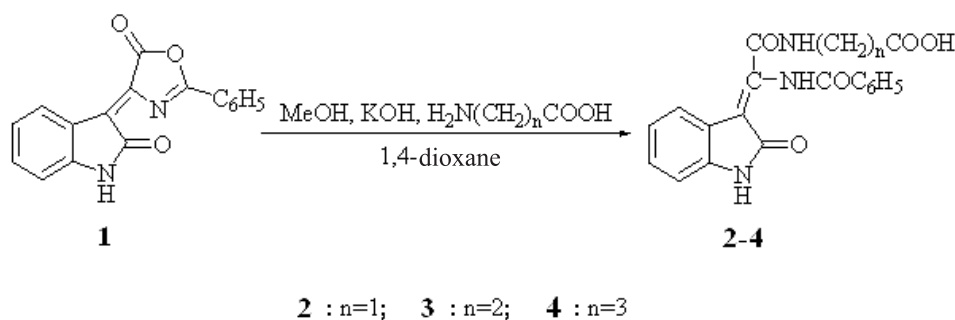
The aim of our research is the synthesis of a new group of chemical compounds – N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acids and their ethyl esters as potential biologically active substances [8-10].

An attempt to obtain N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acids using the traditional method leads to target products (**2-4**) with 45-50% yields. We offered the method with the use of methanol solution of potassium hydroxide and 1,4-dioxane, it allowed to increase the acid (**2-4**) yields up to 95% preserving a sufficient degree of their purity (Scheme 1).

The amino acids (**2-4**) synthesized are yellow crystalline substances with precious melting points after crystallization from 1,4-dioxane (Tab. 1); soluble when heating in ethanol, dioxane, DMFA, DMSO.

The pharmacological research of (2-oxoindolin-3-ylidene)-2-oxoacetic acid derivatives allow making a conclusion that the highest nootropic activity is shown by substances containing amino acid esters moieties [5-7]. Taking this fact into account it was expedient to carry out the synthesis of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acid and, first of all, N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine ethyl ester.

Compound (**5**) was obtained by esterification of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]

Scheme 1. Interaction of azlactone of 2-(benzoylamino)(2-oxoindolin-3-ylidene)acetic acid (**1**) with amino acids.

glycine (**2**) in absolute ethanol [3]. Ethyl esters of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine (**5.1-5.5**) were synthesized by alkylation of the acid (**2**) in the presence of potassium carbonate in DMSO solution. These compounds can be also obtained by heating azlactones containing aliphatic substituents in 1 position of the oxoindoline cycle (**1.1-1.5**) with glycine ethyl ester hydrochloride in the ethanol media (Scheme 2).

N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine ethyl esters (**5-5.5**) after crystallization from 1,4-dioxane are yellow crystalline substances with precious melting points (Table 1), soluble in ethanol, dioxane, DMFA, DMSO.

The structure of compounds (**5-5.5**) were confirmed by the data of elemental analysis, IR- and  $^1\text{H}$  NMR-spectroscopies (Tab. 2).

IR-spectra of the compounds synthesized, except the stretching bands  $\nu$  N-H 3332 and 3291  $\text{cm}^{-1}$  (**2-4**) and 3297  $\text{cm}^{-1}$  (**5-5.5**), have an increased intensity of stretching bands  $\nu$  C-H in the range of 3150-2928  $\text{cm}^{-1}$ , and it indicates the presence of aliphatic substituents. The stretching band  $\nu$  C=O at 1733 (**2-4**) and 1737  $\text{cm}^{-1}$  (**5-5.5**) testifies the presence of the carbonyl group in the structure bonded to the alkyl radical [1, 4].

In  $^1\text{H}$  NMR spectrum of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine (**2**) the signal of

the methylene group of amino acid is recognized as a duplet at  $\delta$  4.0 ppm. The signal of the carboxyl group proton in the spectrum of the acid is not observed as a result of the deuterium exchange. The signal of the  $\text{CH}_2$ -group is shifted downfield (4.08 ppm) for the ester (**5**). The signals of the ethoxy-group are observed as a quartet at 4.20 ppm (2H,  $\text{CH}_2$ ) and a triplet at 1.21 ppm (3H,  $\text{CH}_3$ ) [13].

### Experimental Part

When studying the objects under research in order to confirm the structure and purity of the substances synthesized the physical and chemical methods described in the State Pharmacopeia of Ukraine were used [2].

Melting points were determined by the capillary method on a "PTM (M)" apparatus. The elemental analysis of Nitrogen was carried out on an automatic analyser "CNH", model EA 1108 "Carlo Erba".

IR-spectra were registered on a "Tensor 27" apparatus in KBr tablets, the concentration of the substance – 1%.

$^1\text{H}$  NMR spectra of the compounds synthesized were recorded on a Varian Mercury VX-200 spectrophotometer (200 MHz). The solvent was  $\text{DMSO-D}_6$ , the internal standard was tetramethylsilane (TMS). Chemical shifts are given at the ppm scale.

The data of elemental analysis correspond to the calculated one.

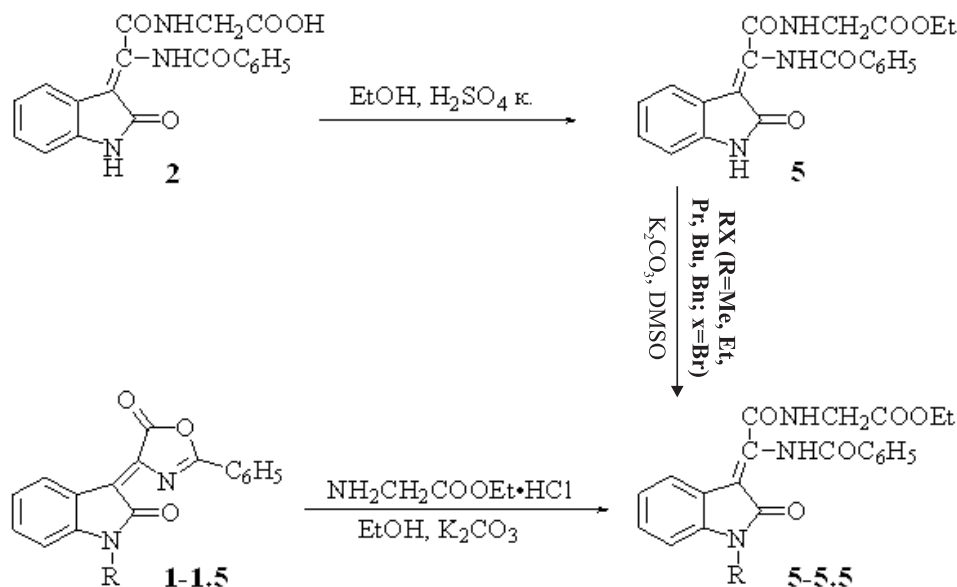
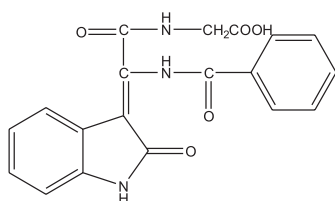
Scheme 2. Synthesis of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine ethyl ester (**5-5.5**).

Table 1

Characteristics of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acids (2-4) and ethyl esters (5-5.5)

Compound	Molecular formula	Found N, % Calculated N, %	Melting point, °C	Yield, %
2	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	11.51 11.50	250-252	95
3	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	11.07 11.08	250-252	93
4	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	10.66 10.68	222-223	92
5	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	10.65 10.68	248-250	92
5.1	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	10.34 10.31	232-234	84
5.2	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	9.98 9.97	174-176	81
5.3	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	9.63 9.65	160-162	88
5.4	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	9.37 9.35	153-155	86
5.5	C <sub>28</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	8.67 8.69	196-198	99

N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine (2)



To the solution of 0.3 g (0.005 mol) of KOH in 10 cm<sup>3</sup> of methanol add 0.4 g (0.005 mol) of glycine. Transfer the mixture obtained into solution of 1.45 g (0.005 mol) of 3-(5-oxo-2-phenyl-1,3-oxazole-4(5H)-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one (1) in 10 cm<sup>3</sup> of 1,4-dioxane. Heat the reaction mixture with a reflux on a water bath for 60 min, then cool and transfer into water acidified by chloric acid. Filter the precipitate, wash with water, dry and crystallize from 1,4-dioxane. The

Table 2

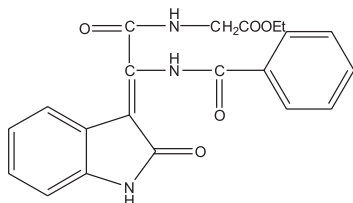
<sup>1</sup>H NMR spectra of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acids (2-4) and ethyl esters (5-5.5)

Compound	Chemical shifts, δ, ppm.				
	NHCO (1H, c)	NH-indol (1H, c)	CONH (1H, τ)	Ar-H	Protons signals of other functional groups
2	12.89	11.05	9.18	8.01-6.75, m, 9H	3.91 (2H, d, CH <sub>2</sub> )
3	12.81	11.01	8.91	8.02-6.81, m, 9H	3.51 (2H, m, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.61 (2H, t, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )
4	12.85	11.07	8.09	7.95-6.90, m, 9H	3.35 (2H, m, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.27 (2H, t, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.78 (2H, m, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )
5	12.92	11.10	9.28	8.02-6.92, m, 9H	4.09 (4H, m, NHCH <sub>2</sub> +CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 1.21 (3H, t, CH <sub>3</sub> )
5.1	12.89		9.21	8.02-6.82, m, 9H	4.11 (4H, m, NHCH <sub>2</sub> +OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 3.25 (3H, s, NCH <sub>3</sub> ); 1.21 (3H, t, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
5.2	12.88	-	9.24	7.98-6.83, m, 9H	4.18 (4H, m, CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> ); 3.80 (2H, t, NCH <sub>2</sub> ); 1.20 (6H, m, 2CH <sub>3</sub> )
5.3	12.89	-	9.23	7.95-6.81, m, 9H	4.12 (4H, m, CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> ); 3.80 (2H, t, NCH <sub>2</sub> ); 1.65 (2H, m, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 1.21 (3H, t, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 0.89 (3H, m, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
5.4	12.89	-	9.24	7.95-6.83, m, 9H	4.20 (4H, m, CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> ); 3.75 (2H, t, NCH <sub>2</sub> ); 1.67 (2H, m, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.23 (2H, m, N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 1.20 (3H, t, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 0.88 (3H, t, N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> )
5.5	12.81	-	9.31	7.98-6.81, m, 14H	5.02 (2H, s, NCH <sub>2</sub> ); 4.12 (4H, m, CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> ); 1.19 (3H, t, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )



yield is 1.72 g (95%), m.p. 250-252°C. Compounds (3,4) are obtained in the same manner.

**N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine ethyl ester (5)**



**Method A.** In a round-bottomed flask place 1.82 g (0.005 mol) of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine (2), 15 cm<sup>3</sup> of absolute ethanol and 0.2 ml of the concentrated sulfuric acid. Heat the flask with a reflux and a drying tube on a water bath for 90 min. In 12 hours filter the precipitate formed, wash with water, dry and crystallize from 1,4-dioxane. The yield is 1.8 g (92%), m.p. 248-250°C. Compounds (5.1-5.5) are obtained in the same manner.

**Method B.** To 1.45 g (0.005 mol) solution of 3-(5-oxo-2-phenyl-1,3-oxazole-4(5H)-ylidene)-1,3-dihydro-

2H-indol-2-one) (1) in 15 cm<sup>3</sup> of ethanol add 1.4 cm<sup>3</sup> (0.005 mol) of triethylamine and 1.04 g (0.005 mol) of glycine ethyl ester hydrochloride. Heat the reaction mixture with a reflux on a water bath for 60 min, then cool and transfer into water acidified by chloric acid. Filter the precipitate, wash with water, dry and crystallize from 1,4-dioxane. The yield is 1.8 g (92%), m.p. 248-250°C. The mixed sample of the compounds obtained by A and B methods does not possess melting point depression, their <sup>1</sup>H NMR-spectra are identical.

**CONCLUSIONS**

1. The method for obtaining of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]amino acids with the use of methanol solution of potassium hydroxide and 1,4-dioxane has been developed, and it allows to increase the yields of target products up to 95% preserving a sufficient degree of their purity. Ethyl esters of N-[2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetyl]glycine have been synthesized.

2. The structure of the compounds synthesized has been proven by the data of elemental analysis, IR- and <sup>1</sup>H NMR-spectroscopy.

**REFERENCES**

1. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. – 590 с.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ООО «РИРЕГ», 2001. – 556 с.
3. Колісник С.В., Болотов В.В., Алтухов О.О., Шишкіна С.В. // ЖОФХ. – 2010. – Т. 8, вип. 3 (31). – С. 65-70.
4. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. – М.: Мир, 1965. – 216 с.
5. Пат. на корисну модель №38064 (2008) Україна // Б.В. – 2008. – №24.
6. Пат. на винахід №89542 (2010) Україна // Б.В. – 2010. – №3.
7. Пат. на винахід №90357 (2010) Україна // Б.В. – 2010. – №8.
8. Шатілов О.В., Штриголь С.Ю., Колісник С.В. та ін. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2009. – Т. 9, Вип. 2(26). – С. 139-142.
9. Штриголь С.Ю., Стіхарний О.О., Колісник С.В. та ін. // Вісник фармації. – 2008. – №4 (56). – С. 75-77.
10. Штриголь С.Ю., Стіхарний О.О., Колісник С.В. та ін. // Вісник фармації. – 2008. – №3 (55). – С. 60-63.
11. Andreani A., Rambaldi M., Locatelli A. et al. // Acta Pharm. Nord. – 1991. – Vol. 3, №1. – P. 5-8.
12. Bouchikhi F., Rossignil E., Sancelme M. et al. // Eur. J. Med. Chem. – 2008. – №43. – P. 2316-2322.
13. Breitmaier E. Structure elucidation by NMR in organic chemistry. – 3<sup>rd</sup> ed. – Chichester: John Wiley & Sons, 2002. – 258 p.
14. Gruda J. // Can. J. Chem. – 1972. – Vol. 50, №1. – P. 18-23.
15. Hodjes R., Shannon J.S., Jamieson W.D., Taylor A. // Can. J. Chem. – 1968. – Vol. 46, №13. – P. 2189-2194.
16. Kenichi O., Ryota Sh., Takashi O. et al. // Bioorg. & Med. Chem. – 2008. – Vol. 16, №23. – P. 10001-10012.
17. Nagarajan K., Talwaker P., Goud A. et al. // Ind. J. Chem. «B». – 1998. – Vol. 27, №12. – P. 1113-1123.
18. Stefanovich G., Mihailovich S. // Glasnik Khem. Drushiva. – 1959. – №22. – P. 459-471.
19. Terzioglu N., Karali N., Gürsoy A. et al. // ARKIVOC. – 2006. – Vol. 1. – P. 109-115.
20. Wikerson W., Kergaye A., Tam W. // J. Med. Chem. – 1993. – Vol. 36, №20. – P. 2899-2907.

**СИНТЕЗ І ВЛАСТИВОСТІ ЕТИЛОВИХ ЕСТЕРІВ N-[2-(БЕНЗОІЛАМІНО)(2-ОКСОІНДОЛІН-3-ІЛІДЕН)АЦЕТИЛ]АМІНОКИСЛОТ**

**О.О.Алтухов**

**Ключові слова:** синтез; похідні 2-(бензоіламіно)(1-R-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден) оцтових кислот; аз лактон; амінокислоти; етилові естери

Аналіз наукової та патентної літератури свідчить про перспективність пошуку біологічно активних сполук серед похідних 2-оксоіндоліну, серед яких відомі амінокислоти (триптофан),

нейрогормон серотонін, ряд природних алкалоїдів і синтетичних лікарських засобів (індометацин, димекарбін). На кафедрі аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету протягом багатьох років проводяться широкі дослідження в галузі розробки методів синтезу та вивчення фізико-хімічних і біологічних властивостей гетерилкарбонових кислот, зокрема, 2-оксоіндоліноцтових кислот і продуктів їх перетворення з метою пошуку активних та нешкідливих лікарських засобів. Фармакологічні дослідження похідних (2-оксоіндолін-3-іліден)-2-оксицтової кислоти дозволили зробити висновок, що найбільшу ноотропну активність проявляють речовини, до складу яких входять залишки естерів амінокислот. Розширюючи напрямки цілеспрямованого пошуку БАВ, а також спираючись на попередні дослідження, ми вирішили до базової структури 2-(бензоіламіно)(2-оксоіндолін-3-іліден)оцтової кислоти ввести фрагменти амінокислот і здійснити синтез етилових естерів N-[2-(бензоіламіно)(1-R-2-оксоіндолін-3-іліден)ацетил]амінокислот. Будову сполук доведено даними елементного аналізу, ІЧ- та ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопії. В ЯМР  $^1\text{H}$ -спектрі N-[2-(бензоіламіно)(1-R-2-оксоіндолін-3-іліден)ацетил]єліцину сигнал метиленової групи амінокислотного залишку проявляється у вигляді дублету при  $\delta$  4,0 м.ч. Сигнал протону карбоксильної групи у спектрі зазначеної кислоти не спостерігається внаслідок дейтерообміну. Для естеру сигнал  $\text{CH}_2$ -групи зміщується у більш слабе поле 4,08 м.ч. Сигнали етоксильної групи мають вигляд квартету при 4,20 м.ч. ( $2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2$ ) та триплету при 1,21 м.ч. ( $3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ).

### **СИНТЕЗ І СВОЙСТВА ЕТИЛОВИХ ЕФИРОВ N-[2-(БЕНЗОІЛАМИНО)(2-ОКСОІНДОЛІН-3-ИЛИДЕН)АЦЕТИЛ]АМИНОКИСЛОТ**

**А.А.Алтухов**

**Ключевые слова:** синтез; производные 2-(бензоиламино)(1-R-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)уксусных кислот; азлактон; аминокислоты; этиловые эфиры

Анализ научной и патентной литературы свидетельствует о перспективности поиска биологически активных соединений среди производных 2-оксоиндолина, среди которых известны аминокислоты (триптофан), нейрогормон серотонин, ряд природных алкалоидов и синтетических лекарственных средств (индометацин, димекарбин). На кафедре аналитической химии Национального фармацевтического университета в течение многих лет проводятся широкие исследования в области разработки методов синтеза и изучения физико-химических и биологических свойств гетерилкарбоновых кислот, в частности, 2-оксоиндолин-уксусных кислот и продуктов их преобразования с целью поиска активных и безвредных лекарственных средств. Фармакологические исследования производных (2-оксоиндолин-3-илиден)-2-оксиуксусной кислоты позволили сделать вывод, что наибольшую ноотропную активность проявляют вещества, в состав которых входят остатки эфиров аминокислот. Расширяя аспекты целенаправленного поиска БАВ, а также опираясь на предыдущие исследования, мы решили в базовую структуру 2-(бензоиламино)(2-оксоиндолин-3-илиден)уксусной кислоты ввести фрагменты аминокислот и осуществить синтез этиловых эфиров N-[2-(бензоиламино)(1-R-2-оксоиндолин-3-илиден)ацетил]амінокислот. Строение соединенный доказано данными элементного анализа, ИК- и ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопии. В ЯМР  $^1\text{H}$  спектре N-[2-(бензоиламино)(1-R-2-оксоиндолин-3-илиден)ацетил]єліцина сигнал метиленовой группы амінокислотного остатка проявляется в виде дублета при  $\delta$  4,0 м.ч. Сигнал протона карбоксильной группы в спектре указанной кислоты не наблюдается вследствие дейтерообмена. Для эфира сигнал  $\text{CH}_2$ -групи смещается в более слабое поле 4,08 м.ч. Сигналы етоксильной группы имеют вид квартета при 4,20 м.ч. ( $2\text{H}$ ,  $\text{CH}_2$ ) и триплета при 1,21 м.ч. ( $3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ).

Recommended by Doctor of Pharmacy, professor V.S.Kyslychenko

UDC 615.322:547.596:547.587:543.544.5

## INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN “APISED” CAPSULES BY THE METHOD OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

O.S.Shpychak, O.I.Tikhonov

National University of Pharmacy

*Key words: terpenoids; flavonoids; essential oils; high-performance liquid chromatography*

*As high-performance liquid chromatography is the most optimal method for qualitative and quantitative analysis of multicomponent medicines, including phytomedicines, – owing to the possibility to identify and quantify the substances of different volatility degree in the same sample, – the qualitative composition and quantitative content of the complex apiphytomedicine “Apised” developed in the form of capsules for treatment of mental and emotional disorders and depression states in sports medicine has been investigated using HPLC-analyser on the basis of a Milichrome A-02 chromatograph. At the preliminary stage of our research of the active pharmaceutical ingredients of “Apised” capsules and the apiphytomedicine directly developed it has been found that there are 14 compounds in the composition of the standardized substance of natural powdered honey, 19 compounds in the composition of the garden balm herb, 24 compounds in the composition of the hop cones, 20 compounds in the composition of the inflorescences of spike lavender, 27 compounds in the composition of “Apised” capsules. By comparing the retention times and spectral ratios of the peaks obtained with the device database the presence of linalool, rosmarinic and chlorogenic acids in the composition of the garden balm herb, quercetin and myrcene in the composition of the hop cones, linalool in the composition of the inflorescences of spike lavender, linalool and myrcene in the composition of natural powdered honey has been shown. The experimental data concerning the percentage of biologically active substances in the apiphytomedicine “Apised” correlate well with the composition of the medicine developed and the literary information about the chemical composition of the medicinal plant raw material studied. The method offered gives the possibility to carry out standardization of the composition of the medicine developed, namely “Apised” capsules, regardless of the way of obtaining and origin of the medicinal plant raw material.*

To treat mental and emotional disorders and depressions states in sports medicine the complex apiphytomedicine “Apised” in the form of capsules [2] has been developed at the Department of Pharmacy Technology of Drugs of the National University of Pharmacy; its main active pharmaceutical ingredients (APhI) are the standardized substance of natural powdered honey (NPH) and the essential oil plant raw material such as the garden balm herb (*Herba Melissa officinalis*), the hop cones (*Strobuli Humuli lupuli*) and the inflorescences of spike lavender (*Flores Lavandulae angustifoliae*) [5].

As high-performance liquid chromatography (HPLC) is considered to be the most optimal method for qualitative and quantitative analysis of multicomponent medicines, including phytomedicines [6, 10, 12], we have set a goal to carry out the research of the apiphytomedicine developed just by this method.

Previously the qualitative composition and quantitative content of the main components of essential oils of APhI of “Apised” capsules was investigated by us using the method of gas chromatography, however, the method developed allows to determine only volatile compounds included in the composition of the medicine [11].

Unlike other research methods of biologically active compounds the advantage of HPLC method con-

sists exactly in the possibility to identify and quantify the substances of different volatility degree in the same sample under the chromatographic conditions carefully selected. The presence of such conditions is provided by using the so-called HPLC-analyser – it is the approach, which essence consists in carrying out the analysis of compounds of a certain list (from 20 to 500 substances) using the same chromatographic system. For this purpose the database for the array of standard substances is compiled, and further identification of peaks on chromatograms of the test samples is carried out by comparison of their retention times, as well as spectral ratios with this database [7, 9, 10]. One of the variants of such a system was developed on the basis of a Milichrome A-02 chromatograph (“EcoNova” JSC, Novosibirsk, Russian Federation) [1] are among them.

In the work the results of determination of biologically active substances of “Apised” capsules and their individual ingredients using the system of HPLC-analyser mentioned have been given.

### Materials and Methods

The following samples of APhI of “Apised” capsules as the garden balm herb – *Herba Melissa officinalis* L. (the registration certificate No. UA/8919/01/01, batch 60612) manufactured by “Liktravy” PJSC (Zhy-

Table 1

The basic chromatographic parameters of linalool, myrcene, rosmarinic acid, quercetin and chlorogenic acid when determining by the HPLC method

Substance	$t_{R}$ , min	$V_R$ , mcl	$R(S_{\lambda} / S_{210})$							
			$\frac{210 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{220 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{230 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{250 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{260 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{270 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{280 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$	$\frac{330 \text{ nm}}{210 \text{ nm}}$
Chlorogenic acid	9.46	9460	1.0000	0.8780	0.6022	0.1537	0.2095	0.2248	0.2473	0.5247
Rosmarinic acid	12.53	1253	1.0000	0.8647	0.6565	0.5564	0.4277	0.3956	0.4905	0.9269
Quercetin	14.16	1416	1.0000	0.6439	0.4958	0.1953	0.1232	0.1612	0.2840	0.4679
Linalool	20.76	2076	1.0000	0.5252	0.4020	0.8165	0.8135	0.5118	0.4426	0.6019
Myrcene	27.20	2720	1.0000	0.7997	0.6846	0.6533	0.4298	0.3127	0.3253	0.7136

tomyr, Ukraine); the hop cones – *Strobuli Humuli lupuli L.* (the registration certificate No.UA/11477/01/01, batch 003) manufactured by “Liktavy” PJSC (Zhytomyr, Ukraine); the inflorescences of spike lavender – *Flores Lavandulae angustifoliae Mill.* cultivated on the territory of Nikitsky Botanical Garden of UAAS; NPH (amendment No.1:2013 to the Ukrainian specification 01.2-02010936-001:2007) obtained by freeze drying under conditions of “Biolik” JSC (Kharkiv) using the “Virtis” production equipment (USA); as well as “Apised” capsules [2, 5] were the objects of our research.

The standard samples of compounds such as linalool (batch W263516), myrcene (batch 64643), rosmarinic acid (batch 00390580) produced by Sigma-Aldrich Chemie GmbH company (Germany) and pharmacopeial standard samples of quercetin (batch 050107) and chlorogenic acid (batch 140308) were used in our work.

The chromatographic procedure was carried out using a Milichrome A-02 chromatograph.

The chromatographic conditions were:

- column –  $\varnothing 2 \times 75$  mm;
- reversed phase – ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ (“Bischoff Analysentechnik und Geräte GmbH”, Germany);
- efficiency – not less than 5000 theoretical plates;
- temperature – 40°C;
- eluent A – [4 mole/l  $\text{LiClO}_4$  – 0.1 mole/l  $\text{HClO}_4$ ] –  $\text{H}_2\text{O}$  (5:95);
- eluent B – acetonitrile “for HPLC”;
- flow rate – 100 mcl/min;
- elution – a linear gradient from 5% to 100% of acetonitrile for 40 min, then 100% acetonitrile for 3 min;
- detector – UV-spectrophotometer with 8 wavelengths (210, 220, 230, 250, 260, 270, 280 and 330 nm).

The chromatographic HPLC-system suitability is periodically controlled by chromatographing the special control multicomponent solution.

The sample preparation was carried out in the following way: 0.2000 g of the corresponding test sample was extracted by 20.00 ml of 96% ethanol; the solutions obtained were filtered and analysed under the conditions mentioned above; not less than 5 chromatograms were developed – the sample volume was 4 mcl.

### Results and Discussion

At the preliminary stage of our research of the active pharmaceutical ingredients of “Apised” capsules and the

apiphytomedicine directly developed it has been found that there are 14 compounds in the composition of the standardized substance of natural powdered honey, 19 compounds in the composition of the garden balm herb, 24 compounds in the composition of the hop cones, 20 compounds in the composition of the inflorescences of spike lavender, 27 compounds in the composition of “Apised” capsules.

By comparing the retention times and spectral ratios of the peaks obtained with the device database the presence of linalool, rosmarinic and chlorogenic acids in the composition of the garden balm herb, quercetin and myrcene in the composition of the hop cones, linalool in the composition of the inflorescences of spike lavender, linalool and myrcene in the composition of natural powdered honey has been shown.

To increase reliability of identification of the compounds previously determined the standard samples (SS) of linalool, myrcene, quercetin, rosmarinic and chlorogenic acids added to the test samples after the primary identification were used, and the repeated research was conducted.

Increase of the peak area of the corresponding compounds and the absence of peaks split in this case confirm the supposition concerning the structure of the compounds identified made during the primary analysis.

The basic chromatographic parameters of the compounds identified under the conditions of performing the analysis are given in Tab. 1.

The typical chromatogram of biologically active compounds of the apiphytomedicine “Apised” obtained under conditions of the experiment is given in Figure.

For quantitative determination of the substances identified in the composition of APhI of the apiphytomedicine studied and namely “Apised” capsules at the first stage of the experimental research the batch of model solutions of linalool, myrcene, quercetin, rosmarinic and chlorogenic acids SS was prepared, they were chromatographed under the conditions mentioned above and possibility of carrying out the quantitative analysis of the given substances within the concentrations range from 0.1 to 1 mg/ml was shown. At the second stage of the research the content of each component was calculated according to the chromatograms of the solutions studied with SS addition and without it.

The quantitative content (%) of the basic compounds identified in the apiphytomedicine developed and its separate constituents is given in Tab. 2.

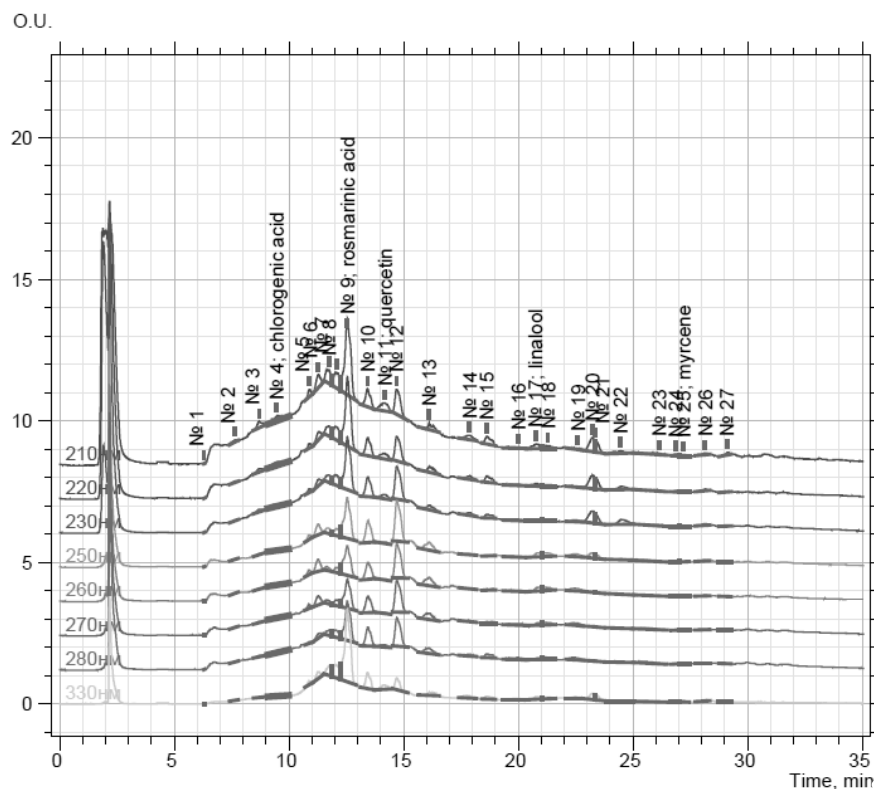


Fig. The typical chromatogram of biologically active compounds of "Apised" capsules obtained by the HPLC method under the conditions mentioned above.

Table 2

The results of the quantitative determination of linalool, myrcene, rosmarinic acid, quercetin and chlorogenic acid by the HPLC method

Compound	Peak area		Content, %
	S	S <sub>ad</sub>	
Garden balm herb			
Linalool	0.18146	0.32645	0.18%
Rosmarinic acid	0.22210	0.44618	1.71%
Chlorogenic acid	0.13256	0.23589	0.16%
Hop cones			
Quercetin	0.32156	0.48957	0.21%
Myrcene	0.21387	0.44782	0.12%
Inflorescences of spike lavender			
Linalool	0.12065	0.26048	0.12%
natural powdered honey			
Myrcene	0.30102	0.44782	0.19%
Linalool	0.11018	0.24536	0.11%
"Apised" capsules			
Linalool	0.14618	0.28128	0.14%
Rosmarinic acid	0.06121	0.28947	0.45%
Chlorogenic acid	0.05875	0.15245	0.07%
Quercetin	0.09548	0.26518	0.06%
Myrcene	0.15425	0.30007	0.09%

It should be noted that the experimental data of Tab. 2 concerning the percentage of biologically active compounds determined in the apiphytomedicine "Apised" correlate well with the composition of the medicine developed and the literary information about the chemical composition of the medicinal plant raw material studied [3, 4, 8].

Thus, the complex of the experimental research conducted concerning identification and quantitative determination of biologically active substances of APhi of the apiphytomedicine developed allows to develop the reliable and reproducible method, which gives the possibility to carry out standardization of "Apised" capsules developed.

#### CONCLUSIONS

1. The qualitative composition and quantitative content of the complex apiphytomedicine "Apised" developed in the form of capsules for treatment of mental and emotional disorders and depression states in sports medicine has been investigated using HPLC-analyser on the basis of a Milichrome A-02 chromatograph.

2. The presence of 27 compounds has been detected in the composition of the "Apised" apiphytomedicine developed; among them linalool, myrcene, rosmarinic acid, quercetin and chlorogenic acid have been identified.

3. The method offered gives the possibility to carry out standardization of the composition of the medicine developed, namely "Apised" capsules, regardless of the way of obtaining and origin of the medicinal plant raw material with the help of high-performance liquid chromatography.

## REFERENCES

1. Барам Г.И., Болотов В.В., Изотов Б.Н. и др. // Журн. хроматограф. общества. – 2004. – Т. IV, №1. – С. 11-20.
2. Пат. 77952 Україна, МПК (2006.01) А 61 К 9/48, А 61 Р 25/20. Лікувально-профілактичний засіб у формі капсул із седативною дією / О.С.Шпичак, О.І.Тихонов. – № у 2012 05333. – Заявл.: 15. 01. 2013. Опубл.: 11. 03. 2013. – Бюл. №5. – 5 с.
3. Попова Н.В., Литвиненко В.И. Лекарственные растения мировой флоры. – Х.: СПДФО Мосякин В.Н., 2008. – 510 с.
4. Приймак Г.М. Продукти бджільництва та лікарські рослини в народній медицині. – К.: ІАЕ УААН, 2001. – 530 с.
5. Шпичак О.С., Яковлева Л.В., Шаповал О.М. // Укр. біофармац. журн. – 2012. – №5-6 (22-23). – С. 78-83.
6. European Pharmacopoeia / European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – 6<sup>th</sup> ed. – Council of Europe, 2007. – 3308 p.
7. Fanali S., Haddad P.R., Poole C. et al. Liquid Chromatography: Applications. – Elsevier, 2013. – 683 p.
8. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Heinrich M. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. – London: Churchill Livingstone, 2004. – 309 p.
9. McMaster M.C. HPLC, a practical user's guide. – 2<sup>nd</sup> ed. – John Wiley & Sons, Inc., 2007. – 239 p.
10. Moldoveanu S.C., David V. Essentials in Modern HPLC Separations. – Elsevier, 2013. – 533 p.
11. Shpychak O.S., Tikhonov O.I., Khanin V.A. // News of Pharmacy. – 2013. – №4 (76). – P. 23-27.
12. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction in modern liquid chromatography. – 3rd ed. – John Wiley & Sons, Inc., 2010. – 957 p.

**ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ КАПСУЛ «АПІСЕД» МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ****О.С.Шпичак, О.І.Тихонов****Ключові слова:** терпеноїди; флавоноїди; вискооефективна рідинна хроматографія

З огляду на те, що найбільш оптимальним методом для якісного та кількісного аналізу багатоконпонентних лікарських засобів, у тому числі і фітопрепаратів, є метод вискооефективної рідинної хроматографії – завдяки можливості ідентифікувати та кількісно визначити в одній пробі речовини різного ступеня леткості, досліджено якісний склад та кількісний вміст розробленого комплексного апіфітопрепарату «Апісед» у формі капсул для застосування у спортивній медицині з використанням «ВЕРХ-аналізатора» на основі хроматографа «Міліхром А-02». На попередньому етапі досліджень активних фармацевтичних інгредієнтів капсул «Апісед» та безпосередньо розробленого апіфітопрепарату було встановлено наявність 14 сполук у складі стандартизованої субстанції меду натурального порошкоподібного, 19 сполук – трави меліси лікарської, 24 сполуки – шишок хмелю звичайного, 20 сполук – суцвіть лаванди вузьколистої, 27 сполук – капсул «Апісед». Шляхом порівняння часу утримування та спектральних відношень отриманих піків з «базою даних» приладу було показано присутність у складі трави меліси лікарської ліналоолу, розмаринової та хлорогенової кислот, шишок хмелю звичайного – кверцетину та мірцену, суцвіть лаванди вузьколистої – ліналоолу, меду натурального порошкоподібного – ліналоолу та мірцену. Експериментальні дані щодо відсоткового вмісту біологічно активних речовин в апіфітопрепараті «Апісед» добре корелюють зі складом розробленого препарату та літературними даними відносно хімічного складу досліджуваної лікарської рослинної сировини. Запропонована методика дає можливість незалежно від способу отримання та походження лікарської рослинної сировини провести стандартизацію складу розробленого препарату – капсул «Апісед».

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ КАПСУЛ «АПИСЕД» МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ****О.С.Шпичак, А.И.Тихонов****Ключевые слова:** терпеноиды; флавоноиды; высокоэффективная жидкостная хроматография

Ввиду того, что наиболее оптимальным методом для качественного и количественного анализа многокомпонентных лекарственных средств, в том числе и фитопрепаратов, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии – благодаря возможности идентифицировать и количественно определять в одной пробе вещества разной степени летучести, исследован качественный состав и количественное содержание разработанного комплексного апифитопрепарата «Аписед» в форме капсул для применения в спортивной медицине с применением «ВЭЖХ-анализатора» на основе хроматографа «Милихром А-02». На предварительном этапе исследованы активные фармацевтические ингредиенты кап-

сул «Аписед» и непосредственно разработанного апифитопрепарата было установлено наличие 14 соединений в составе стандартизированной субстанции меда натурального порошкообразного, 19 соединений – травы мелиссы лекарственной, 24 соединения – шишек хмеля обыкновенного, 20 соединений – соцветий лаванды узколистой, 27 соединений – капсул «Аписед». Путем сравнения времени удерживания и спектральных отношений полученных пиков с «базой данных» прибора было показано присутствие в составе травы мелиссы лекарственной линалоола, розмариновой и хлорогеновой кислот, шишек хмеля обыкновенного – кверцетина и мирцена, соцветий лаванды узколистой – линалоола, меда натурального порошкообразного – линалоола и мирцена. Экспериментальные данные относительно процентного содержания биологически активных веществ в апифитопрепарате «Аписед» хорошо коррелируют с составом разработанного препарата и литературными данными относительно химического состава исследуемого лекарственного растительного сырья. Предложенная методика дает возможность независимо от способа получения и происхождения лекарственного растительного сырья провести стандартизацию состава разработанного препарата – капсул «Аписед».

Recommended by Doctor of Pharmacy, professor V.S.Bondar

UDC 541.138: 54.061/.062: 543.253: 54-39: 541.459

## QUANTITATIVE DETERMINATION OF POTASSIUM HYDROGENPEROXOMONOSULFATE IN “ECOCID S” DISINFECTANT BY CATHODIC VOLTAMMETRY

M.Ye.Blazheyskiy, O.O.Mozgova

National University of Pharmacy

*Key words: potassium hydrogenperoxomonosulfate; voltammetry; carbosital electrode; SDBS; disinfectant*

The electrochemical behaviour of potassium hydrogenperoxomonosulfate ( $\text{KHSO}_5$ ) in the presence of sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) has been studied using cathodic voltammetry at the carbosital electrode as indicating in the potential range of +1.0...-1.2 V (the reference electrode Ag, AgCl/KCl(sat)) ( $E_p = +0.3$  V). It has been experimentally proven that the height of  $\text{KHSO}_5$  reduction peak decreases and the potential of the reduction peak is shifted toward more electronegative values with increasing of the background electrolyte pH from 0.80 to 7.17. The maximum peak ( $I_p$ ) occurs at a pH of approximately 0.8 and at a pH around 5 the analytical signal almost disappears. The effect of pH on the peak potential ( $E_p$ ) shows the following: when the pH value increases in the interval from 0.8 to 2,  $E_p$  remains almost constant, but  $E_p$  decreases sharply to the negative value with pH increasing over 2. It has been experimentally proven that SDBS leads to increase of the current peak and the peak potential shifts to the more electropositive side (+0.25 → +0.3V). The influence of the present SDBS has been examined. The current peak increases with the concentration of the surfactant up to  $1.2 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> and then stays almost constant with the increase in the concentration of SDBS above  $3.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. The linear relationship was observed in the  $\text{KHSO}_5$  concentration range of  $(1.8-9.0) \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, the calibration curve equation was  $I_p = (4.3 \pm 1.1) \times 10^4 c$  ( $r = 0.998$ ). When determining  $\text{KHSO}_5$  in the test solution of “Ecocid S” disinfectant with the concentrations of  $4.65 \times 10^{-5}$ ,  $6.20 \times 10^{-5}$  and  $7.75 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) the RSDs were 0.025, 0.023 and 0.021, respectively ( $\delta = -0.64 \dots +0.16\%$ ); LOD =  $6.50 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, LOQ =  $2.17 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.

Potassium hydrogenperoxomonosulfate ( $\text{KHSO}_5$ ) is one of the most widely used disinfectants in medical practice, among well-known classes of chemical disinfectants – oxidants. It is included in the new generation of modern disinfection agents in the form of a stable triple potassium salt  $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ , such as “Perform” and modified analogue of “Virkon” – “Ecocid S” (KRKA, Slovenia, Novo mesto).

“Ecocid S” is a complex disinfectant in the form of a granulated water-soluble powder, which contains  $\text{KHSO}_5$  (50%) and such excipients as a surfactant – sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS to 15%), organic acids (malic and sulfamic acids), inorganic buffer systems (sodium polyphosphate, sodium chloride), an indicator of activity – azo dye and flavour with a citron odour. It is characterized by the broad-spectrum antimicrobial activity to bacteria, viruses, fungi, as well as to Mycobacterium tuberculosis [2, 4, 7-9]. It does not have the sensitizing and local irritative effect to the skin and is slightly irritating to the mucous membranes in regulated concentrations (0.5-4% by the active substance). Working solutions remain active for 7 days. It does not have the corrosive action and the negative impact on the surface treated. It is applied for preventive and forced disinfection. SDBD acts as a surfactant, thus providing a contact with the pathogen oxidant; reacts with membrane lipids and proteins causing denaturation of the cell membranes.

Determination (mass fraction) of active oxygen (in terms of active chlorine) in the product is carried out by iodometric titration [15].

Scientific literature describes quantitative determination of  $\text{KHSO}_5$  in “Virkon” disinfectant by the method of pH-potentiometric titration with the standard solution of tin (II) chloride in the presence of potassium bromide using a point platinum and glass electrode [5].

Extensive literature survey reveals that various electrochemical methods have been reported for determination of electrochemically active compounds of various classes, including hydrogen peroxide and inorganic peroxides analysis [11, 13, 14, 20, 21]. Among them the method of voltammetry with the linear potential scan using a drop mercury electrode or its other modifications and solid platinum or gold electrodes is most commonly used. These electrodes are characterized by satisfactory reproducibility of research results and simple methods for their preparation. However, mercury is a toxic substance and other metals are rather expensive. It is also known that oxygen chemisorbs on Au, as well as on Pt, and forms oxide films. Adsorbed oxygen is involved in the anodic process, and Au oxides inhibit processes of the analyte electrooxidation. Thus, the electrodes based on cheap carbon materials such as carbon glass, carbon paste, carbosital are widely used [6, 12, 19]. They are characterized by high overpotential (low adsorption capacity in relation to  $\text{O}_2$  and  $\text{H}_2$  in the poten-



tial work area) of hydrogen and/or oxygen (the ability to track multiple regeneration to obtain reproducible surface). In addition, these electrodes offer the ability to perform such analytical determinations, which mercury or other electrodes are not always possible to do. It has been very popular because of its excellent electrical and mechanical properties, a wide potential range, extreme chemical inertness and relatively reproducible performance [10, 16, 17].

It has been previously proven that SDBS leads to increase of the  $\text{KHSO}_5$  reduction peak at the carbosital electrode and the addition method was used for  $\text{KHSO}_5$  determination in "Ecocid S" disinfectant, which contains SDBS surfactant [3].

In the present work the results of elaboration of the quantitative determination method for  $\text{KHSO}_5$  in the presence of SDBS by cathodic voltammetry at the carbosital electrode using the method of the calibration graph are presented.

### Experimental Part

The solution of  $\text{KHSO}_5$  ("Oxone<sup>®</sup>", ACROS ORGANICS) was freshly prepared and standardized iodometrically. The stock solution was prepared by dissolving 0.1537 g of the powder (triple potassium salt,  $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ ) in a 50 mL volumetric flask by double distilled water to give the concentration of  $9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . 10 mL of  $9 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  solution of  $\text{KHSO}_5$  was diluted in a 100 mL volumetric flask with double distilled water to obtain  $9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  of  $\text{KHSO}_5$  solution.

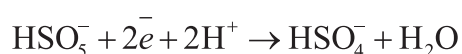
The solution of SDBS was prepared by dissolving 6.96 g of the powder in a 100 mL volumetric flask by double distilled water to give the concentration of  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ .

The background solution was prepared by dissolving 68.1 g of potassium hydrogensulfate ( $\text{KHSO}_4$ ) in a 500 mL volumetric flask by double distilled water to give the concentration of  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

The pH was measured using an ionmeter of I-160M type (Belarus) with a glass electrode of ESL-43-07 type paired with Ag, AgCl/KCl (sat) electrode.

Electrochemical measurements were carried out in an AVS-1.1 analyzer (Volta, St. Petersburg) with a three-electrode scheme by alternating the current mode with a square wave modulation in the potential range of  $+1.0 \dots -1.2 \text{ V}$ ,  $W = 1000 \text{ rpm}$ , the amplitude of  $40 \text{ mV}$ ,  $\nu = 65 \text{ Hz}$ . The values of potential peaks directly at the maximum were measured by the electrochemical sensor "Module EM-04" with the accuracy of  $\pm 5 \text{ mV}$ . The carbosital electrode was used as a working and an auxiliary electrode, and Ag, AgCl/KCl (sat) electrode type EVL-1M4 as a reference electrode.

The scheme of the reduction process is as follows:



### Results and Discussion

*The effect of the nature and pH of the background solution*

It has been experimentally proven that the height of  $\text{KHSO}_5$  reduction peak at the carbosital electrode surface decreases, and the potential of the reduction peak

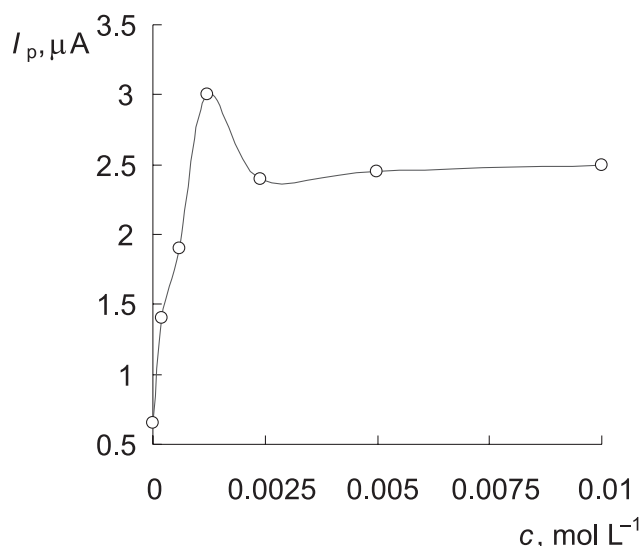


Fig. 1. The effect of the SDBS surfactant concentration on  $\text{KHSO}_5$  reduction peak at the carbosital electrode (the reference electrode Ag, AgCl/KCl (sat));  $c(\text{KHSO}_5) = 5.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $E_p = +0.3 \text{ V}$ .

is shifted toward more electronegative values with increasing of the background electrolyte pH from 0.80 to 7.17. The maximum peak ( $I_p$ ) occurs at the pH of approximately 0.8, and at the pH around 5 the analytical signal almost disappears. The effect of pH on the peak potential ( $E_p$ ) shows the following: when the pH value increases in the interval from 0.8 to 2,  $E_p$  remains almost constant, but  $E_p$  decreases sharply to a negative value with pH increasing over 2. That is why the optimum pH for analysis is  $\leq 2$  [3].

#### *The effect of a surfactant*

It has been experimentally proven that SDBS leads to increase of the current peak and the peak potential shifts to more electropositive side ( $+0.25 \rightarrow +0.3 \text{ V}$ ) (Fig. 1).

The current increases probably due to alleviation of desorption of reduction products from the electrode surface, and acceleration of the electron transfer in the course of electrochemical reactions is caused by the ability of SDBS to adsorb on the hydrophobic surface of the electrode and to form a surface film that changes the overpressure [1, 19, 23].

The influence of the present SDBS was examined. The current peak increases with the concentration of the surfactant up to  $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  and then stays almost constant with the increase in the concentration of SDBS above  $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (Fig. 1). That is why the optimum SDBS concentration for analysis is  $\geq 3.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

It is known that Ecocid S disinfectant contains SDBS in the amount of 15% of the total content, i.e. in 0.5% of the working solution the concentration of SDBS is about  $7.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . So, it was decided to use the method of the calibration graph to quantify the concentration of  $\text{KHSO}_5$  in "Ecocid S" in the presence of SDBS excess ( $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

*The procedure of obtaining results for the calibration graph*

Working solutions were prepared by diluting 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 and 5.00 mL of the stock solution with 10 mL of  $1 \text{ mol L}^{-1}$  background solution and 1 mL of

Table 1

Analytical characteristics of the calibration graph of the  $\text{KHSO}_5$  voltammetric determination procedure in the presence of SDBS

Parameters	Value
Concentration ranges ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$(1.8-9.0) \times 10^{-5}$
Regression equation	$I_p = (4.3 \pm 1.1) \times 10^4 c$
a	$4.3 \times 10^4$
b	0.04
$S_a$	$2.6 \times 10^3$
$S_b$	0.09
$\Delta a$	$1.1 \times 10^4$
$\Delta b$	0.41
Correlation coefficient (r)	0.998
LOD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$6.50 \times 10^{-6}$
LOQ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$2.17 \times 10^{-5}$

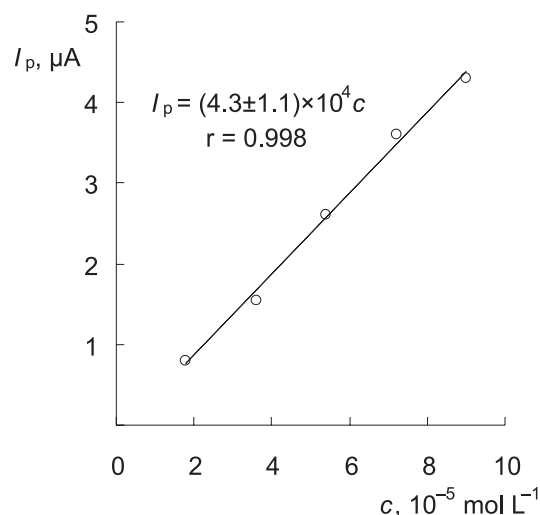


Fig. 2. The calibration graph of the reduction current peak of  $\text{KHSO}_5$  vs. concentration in the presence of SDBS ( $c = 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ );  $E_p = +0.3 \text{ V}$ .

Table 2

The results of voltammetric determination of potassium hydrogenperoxomonosulfate in "Ecocid S" ( $n = 5$ ;  $P = 0.95\%$ )

Taken, $\text{mol L}^{-1}$	Found, $\text{mol L}^{-1}$	Reproducibility ( $\% \pm \text{SD}$ )	RSD, %	$\epsilon$ (%)	$\delta^*$ (%)
$4.65 \times 10^{-5}$	$(4.63 \pm 0.14) \times 10^{-5}$	$99.57 \pm 2.49$	0.025	3.1	-0.43
$6.20 \times 10^{-5}$	$(6.21 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	$100.22 \pm 3.01$	0.023	3.0	+0.16
$7.75 \times 10^{-5}$	$(7.70 \pm 0.20) \times 10^{-5}$	$99.64 \pm 2.32$	0.021	2.55	-0.64

\* Relative to the average reference method of iodometric titration [15].

$0.2 \text{ mol L}^{-1}$  SDBD each in a 50 mL volumetric flask by double distilled water. 25 mL of the working solution of a pure substance was transferred to the cell. The voltammograms were recorded by scanning the potential toward the negative direction in the potential range from +1.0 V to -1.2V. All data were obtained at room temperature.

The graph was plotted in the following coordinates: the height of peaks  $I_p$  in  $\mu\text{A}$  at 0.3 V on the ordinate axis and the corresponding concentration of  $\text{KHSO}_5$   $c$  in  $\text{mol L}^{-1}$  on the abscissa axis (Fig. 2).

Analytical characteristics of the calibration graph of the  $\text{KHSO}_5$  voltammetric determination procedure are given in Tab. 1.

*The procedure for quantitative determination of  $\text{KHSO}_5$  in "Ecocid S"*

The test solution was prepared by dissolving 0.5 g of the powder in a 100 mL volumetric flask by double distilled water to give the concentration of  $7.75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . 10 mL of  $7.75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$   $\text{KHSO}_5$  was diluted in a 100 mL volumetric flask with double distilled water to obtain  $7.75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  of  $\text{KHSO}_5$  solution.

Working solutions were prepared by diluting 3.00, 4.00 and 5.00 mL of the stock solution with 10 mL of  $1 \text{ mol L}^{-1}$  background solution and 1 mL of  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  SDBD each in a 50 mL volumetric flask by double distilled water. 25 mL of the working solution of a pure substance was transferred to the cell. The voltammo-

grams were recorded by scanning the potential toward the negative direction in the potential range from +1.0 V to -1.2V.

The  $\text{KHSO}_5$  content  $C_x$ ,  $\text{mol L}^{-1}$  was calculated by:

$$C_x = \frac{I_p - b}{a}$$

The high sensitivity of this method is accompanied by a very good reproducibility. The reproducibility was evaluated by 5 repeated electrochemical signal measurements of model solutions with the concentrations of  $\text{KHSO}_5$  of  $3.6 \times 10^{-5}$ ,  $4.5 \times 10^{-5}$  and  $5.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . The precision of the method developed in terms of the relative standard deviation (RSD) was 0.025, 0.023 and 0.021 ( $\delta = -0.64 \dots +0.16 \%$ ), respectively. The results obtained are summarized in Tab. 2.

#### CONCLUSIONS

Thus, a new voltammetric method of PMS determination in the presence of SDBS at the carbosital electrode using the method of the calibration graph has been developed and the possibility of its quantitative determination has been shown.

The linear dependence is observed in the PMS concentration range  $(1.8-9.0) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , the calibration curve equation is  $I_p = (4.3 \pm 1.1) \times 10^4 c$  ( $r = 0.998$ ); RSD =  $0.025 \dots 0.021$  and  $\delta = -0.64 \dots +0.16\%$  ( $n = 5$ ;  $P = 0.95\%$ ), LOD =  $6.50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , LOQ =  $2.17 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

## REFERENCES

1. Bakun V.A., Fedulov D.M., Osipova E.A. et al. // *Vestnik MITKhT*. – 2009. – Vol. 4, №3. – P. 80-84.
2. Bengtong Ph., Thomrongsuwannakij T., Chansiripornchai N. // *Thai J. Vet. Med.* – 2013. – Vol. 43 (3). – P. 405-409.
3. Blazheyevskiy M.Ye., Mozgova O.O. // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 5(11). – P. 489-496.
4. Hernandez A., Martro E., Matas L. et al. // *J. Hosp. Infect.* – 2000. – Vol. 46. – P. 203-209.
5. Kreyngold S.U. // *Dez. delo.* – 2003. – Vol. 1. – P. 45-46.
6. Manjunatha J.G., Kumara Swamy B.E., Mamatha G.P. et al. // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2010. – Vol. 5. – P. 1236-1245.
7. Marchetti V., Mancianti F., Cardini G. et al. // *Vet. Res. Com.* – 2006. – Vol. 30. – P. 255-261.
8. McCormick L., Maheshwari G. // *Antiviral Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 27-33.
9. Moslehifard E., Nasirpouri F., Gasemzadeh S. // *J. Islamic Dent. Assoc. Iran (JIDA)*. – 2013. – Vol. 25 (2). – P. 127-133.
10. Ozkan S.A., Uslu B., Enein H.Y. // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 33. – P. 155-181.
11. Ossadnik S., Schwedt G. // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 371. – P. 420-424.
12. Roy P.R., Okajima T., Ohsaka T. // *Bioelectrochem.* – 2003. – Vol. 59. – P. 11.
13. Ruttinger H.-H., Radschuweit A. // *J. Chrom.* – 2000. – Vol. 868. – P. 127-134.
14. Suinjevic D., Blagojevic S., Vucelic D. et al. // *Electroanalysis*. – 1991. – Vol. 9 (1). – P. 861-864.
15. Tsvirova I.M., Panteleeva L.G., Fedorova L.S. et al. *Instruktsiya 1 po primeneniju sredstva ECOCID®, KRKA, Novo mesto (Slovenia) dlja tseley dezinfektsii i predsterilizatsionnoy ochistki.* – M.: FGUN NII dezinfektologii Rospotrebnadzora Rossii, 2007. – 13 p.
16. Uslu B., Ozkan S.A. // *Anal. Lett.* – 2003. – Vol. 40. – P. 817-853.
17. Uslu B., Ozkan S.A. // *Comb. Chem. High Through Screen.* – 2007. – Vol. 10. – P. 495-513.
18. Wang H., Zhang Y., Gao Sh. et al. // *CIESC J.* – 2010. – Vol. 61. – P. 82-85.
19. Wang J. *Electroanalytical Chemistry. 3rd ed.*, Wiley-VCH Pub., NewJerrey, 2006.
20. Westbroek Ph., Hakuzimana J., Gasana E. et al. // *Sensors and Actuators.* – 2007. – Vol. 124. – P. 317-322.
21. Zhang J., Oloman C.W. // *J. Appl. Electrochem.* – 2005. – Vol. 35. – P. 945-953.
22. Ziyatdinova G.K., Ziganshina E.R., Budnikov H.C. // *J. Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 67 (11). – P. 869-879.

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГІДРОГЕНПЕРОКСОМОНОСУЛЬФАТУ КАЛІЮ  
У ДЕЗІНФЕКЦІЙНОМУ ЗАСОБІ «ЕКОЦИД С» МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРІЇ****М.Є.Блажесвський, О.О.Мозгова****Ключові слова:** калію гідрогенпероксомоносульфат; вольтамперометрія; вуглесталовий електрод; NaДБС; дезінфекційний засіб

Методом катодної вольтамперометрії з використанням як індикаторного вуглесталового електрода вивчено електрохімічну поведінку калію гідрогенпероксомоносульфату ( $\text{KHSO}_5$ ) у присутності поверхнево-активної речовини натрію додецилбензенсульфонату (NaДБС) на фоні 0,2 моль/л розчину  $\text{KHSO}_4$  в інтервалі потенціалів  $E = +1,0 \dots -1,2$  В (відн. нас. ХСЕ) ( $E_p = +0,3$  В). Було встановлено, що зі збільшенням рН середовища фонового електроліту від 0,80 до 7,17 висота піку відновлення  $\text{KHSO}_5$  зменшується, а потенціал піку відновлення зсувається у бік більш електронегативних значень, причому при рН біля 5 аналітичний сигнал практично зникає. Максимальний пік ( $I_p$ ) спостерігався при рН 0,8-2, а також за цих умов потенціал піку практично не змінювався. Експериментально встановлено, що NaДБС, котрий входить до складу випробовуваного засобу, призводить до збільшення сили струму у максимумі піку та зсуває потенціал піку у більш електропозитивний бік (+0,25 → +0,3 В). Вивчення впливу концентрації NaДБС на висоту піку відновлення  $\text{KHSO}_5$  показало, що при зростанні концентрації NaДБС до  $1,2 \cdot 10^{-3}$  моль/л висота піку стрімко зростає, а при досягненні  $3,0 \cdot 10^{-3}$  моль/л залишається практично незмінною. Лінійна залежність спостерігалася у діапазоні концентрацій  $\text{KHSO}_5$  (1,8-9,0)  $\cdot 10^{-5}$  моль/л, рівняння градувального графіка:  $I_p = (4,3 \pm 1,1) \cdot 10^4 c$  ( $r = 0,998$ ). При визначенні  $\text{KHSO}_5$  у розчинах дезінфекційного засобу «Екоцид С» з концентраціями  $4,65 \cdot 10^{-5}$ ,  $6,20 \cdot 10^{-5}$  і  $7,75 \cdot 10^{-5}$  моль/л RSD дорівнювало 0,025, 0,023 та 0,021, відповідно ( $\delta = -0,64 \dots +0,16\%$ ); LOD =  $6,50 \cdot 10^{-6}$  моль/л, LOQ =  $2,17 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОГЕНПЕРОКСОМОНОСУЛЬФАТА КАЛИЯ  
В ДЕЗИНФЕКЦИОННОМ СРЕДСТВЕ «ЭКОЦИД С» МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**  
*Н.Е.Блажеевский, Е.А.Мозговая*

**Ключевые слова:** гидрогенпероксомonosульфат калия; вольтамперометрия; углеситалловый электрод; NaДБС; дезинфицирующее средство

Методом катодной вольтамперометрии с использованием как индикаторного углеситаллового электрода изучено электрохимическое поведение гидрогенпероксомonosульфата калия ( $KHSO_5$ ) в присутствии поверхностно-активного вещества додецилбензенсульфоната натрия (NaДБС) на фоне 0,2 моль/л раствора  $KHSO_4$  в интервале потенциалов  $E = +1,0 \dots -1,2$  В (отн. нас. ХСЕ) ( $E_p = +0,3$  В). Было установлено, что при увеличении рН среды фонового электролита от 0,80 до 7,17 высота пика восстановления  $KHSO_5$  уменьшается, а потенциал пика восстановления сдвигается в сторону более электроотрицательных значений, причем при рН около 5 аналитический сигнал практически исчезает. Максимальный пик ( $I_p$ ) наблюдался при рН 0,8-2, а также в этих условиях потенциал пика практически не изменяется. Экспериментально установлено, что NaДБС, который входит в состав исследуемого средства, приводит к увеличению силы тока в максимуме пика и сдвигает потенциал пика в более электроположительную сторону (+0,25→+0,3 В). Изучение влияния концентрации NaДБС на высоту пика восстановления  $KHSO_5$  показало, что при увеличении концентрации NaДБС до  $1,2 \cdot 10^{-3}$  моль/л высота пика стремительно увеличивается, а при достижении  $3,0 \cdot 10^{-3}$  моль/л остается практически неизменной. Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций  $KHSO_5$   $(1,8-9,0) \cdot 10^{-5}$  моль/л, уравнение градуировочного графика:  $I_p = (4,3 \pm 1,1) \cdot 10^4$  с ( $r = 0,998$ ). При определении  $KHSO_5$  в растворах дезинфицирующего средства «Экоцид С» с концентрациями  $4,65 \cdot 10^{-5}$ ,  $6,20 \cdot 10^{-5}$  и  $7,75 \cdot 10^{-5}$  моль/л относительное стандартное отклонение (RSD) составило 0,025, 0,023 и 0,021 соответственно ( $\delta = -0,64 \dots +0,16$  %); LOD =  $6,50 \cdot 10^{-6}$  моль/л, LOQ =  $2,17 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor V.S.Bondar*

UDC 615.283:543.544.943.3:543.061

## DETERMINATION OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF THE UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF DOXYLAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION IN BLOOD IN THE VARIANT OF THE METHOD OF STANDARD

L.Yu.Klimenko, S.M.Trut, S.M.Poluyan

National University of Pharmacy

*Key words: validation; bioanalytical methods; UV-spectrophotometry; doxylamine; method of standard*

*With the purpose of improvement of carrying out the quantitative determinations in forensic and toxicological analysis the possibility of application of the method of standard for UV-spectrophotometric determination of analytes in biological fluids has been studied. The procedure for determination and acceptability estimation of linearity, accuracy and precision for validation of such methods in the variant of the method of standard tested by the example of UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood has been offered. The given procedure provides application of the normalized coordinates. For normalization of the experimental data obtained two approaches have been used: 1) Approach 1: the use of the reference solution with the concentration of the analyte corresponding to its concentration in the final spectrophotometric solution measured under the condition of zero losses for the point of 100% in the normalized coordinates. 2) Approach 2: the use of the reference sample with the concentration of doxylamine corresponding to its concentration for the point of 100% in the normalized coordinates. Estimation of linearity, accuracy and repeatability of the method at the first stage has been performed using the model solutions within the approach based on assumption of insignificance of the uncertainty of the analyte quantitative determination in model solutions  $\Delta_{As}^{model}$  in comparison with the complete uncertainty of the analysis results  $\Delta_{As}$ . At the second stage determination of linearity, accuracy, repeatability and intermediate precision of the method has been carried out on the model samples prepared using the matrix for three parallel runs. It has been shown that the method of standard can be applied for UV-spectrophotometric determination of doxylamine in blood – Approach 1 is more acceptable.*

Currently there is a number of international regulations given directive recommendations on carrying out the validation of bioanalytical methods – “Guidance for Industry: Bioanalytical method validation” (U.S. FDA, 2001) [5], “Guideline on validation of bioanalytical methods” (EMA, 2011) [7], “Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens” (UNODC, 2009) [6] and “Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology” (SWGTOX, 2012) [8].

The papers mentioned are oriented to development of methods for quantitative determination of analytes in biological fluids in the variant of the method of the calibration curve. The method of the calibration curve, undoubtedly, allows to take into account and partially level the influence of the matrix background absorption on the results of determination, but proves its value only in the case of performing routine analyses. In forensic and toxicological analysis we often meet with one-time examinations, and various biological fluids, organs and tissues are sent for the examinations, i.e. it is necessary to determine the analyte quantitatively in several various biological objects, but the necessity of carrying out such determinations can arise rarely enough. In such situation plotting the calibration curve for each matrix

demands rather nonrational time consumption, and to the moment of obtaining the results of analysis they can become irrelevant.

Thus, it is of interest to study the possibility of using the method of standard when carrying out UV-spectrophotometric determination of analytes in biological fluids; in this connection the procedure for determination and acceptability estimation of linearity, accuracy and precision for validation of such methods in the variant of the method of standard [3] developed according to [1] has been offered. The results of testing of the approaches offered by the example of the UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood are given in this paper [2].

### Materials and Methods

*The process solutions:* place 1000.0 mg of doxylamine succinate in a 250.0 ml volumetric flask, dissolve in distilled water and dilute to the volume with the same solvent (standard solution 1, the concentration is 4000 mcg/ml). In seven 100.0 ml volumetric flasks place 32.50; 30.00; 25.00; 20.00; 15.00; 10.00; 5.00 and 18.00 ml of doxylamine succinate standard solution 1, respectively, using a burette and dilute to the volume with distilled water (process solutions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, respectively, with the concentrations of 1300, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200 and 720 mcg/ml, respectively).

Table 1

Metrological characteristics of calibration straight lines  $Y = b \cdot X + a$  obtained using model solutions of doxylamine succinate

Analytical range of the method	Characteristic						
	$b^{model}$	$s_b^{model}$	$a^{model}$		$s_a^{model}$	$RSD_0^{model}$	$R_c^{model}$
$D = 25 - 125\% (g = 5)$	1.005	0.011	-0.407		1.022	0.974	0.9998
Acceptability criterion	-	-	1) $a^{model} \leq 2.353 \cdot s_a^{model}$	satisfied	-	$\leq 2.72\%$	$\geq 0.9976$
			if it is not satisfied 1), then 2) $\leq 2.73\%$	satisfied		satisfied	satisfied
$D = 25 - 150\% (g = 6)$	1.011	0.008	-0.805		0.874	0.939	0.99987
Acceptability criterion	-	-	1) $a^{model} \leq 2.132 \cdot s_a^{model}$	satisfied	-	$\leq 3.00\%$	$\geq 0.9979$
			if it is not satisfied 1), then 2) $\leq 2.73\%$	satisfied		satisfied	satisfied
$D = 25 - 175\% (g = 7)$	0.995	0.012	0.321		1.498	1.724	0.9996
Acceptability criterion	-	-	1) $a^{model} \leq 2.015 \cdot s_a^{model}$	satisfied	-	$\leq 3.18\%$	$\geq 0.9983$
			if it is not satisfied 1), then 2) $\leq 2.73\%$	satisfied		satisfied	satisfied

*The model solutions:* place 100.0 mg of doxylamine succinate in a 500.0 ml volumetric flask, dissolve in 0.1 mole/l of hydrochloric acid solution and dilute to the volume with the same solvent (standard solution 2, the concentration is 200 mcg/ml). In seven 100.0 ml volumetric flasks place 26.00; 24.00; 20.00; 16.00; 12.00; 8.00 and 4.00 ml of the doxylamine succinate standard solution 2, respectively, using a burette and dilute to the volume with 0.1 mole/l of hydrochloric acid solution (model solutions 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, respectively, with the concentrations of 52, 48, 40, 32, 24, 16 and 8 mcg/ml, respectively).

*The reference solution:* place 400.0 mg of doxylamine succinate in a 100.0 ml volumetric flask, dissolve in the 0.1 mole/l of hydrochloric acid solution and dilute to the volume with the same solvent (standard solution 3, the concentration is 4000 mcg/ml). In a 100.0 ml volumetric flask place 18.00 ml of doxylamine succinate standard solution 3 using a burette and dilute to the volume with 0.1 mole/l of hydrochloric acid solution (standard solution 4, the concentration is 720 mcg/ml). In a 50.0 ml volumetric flask place 2.00 ml of doxylamine succinate standard solution 4 and dilute to the volume with 0.1 mole/l of hydrochloric acid solution (the reference solution, the concentration is 28.8 mcg/ml).

*The model samples:* 3 lines in 7 samples (20.00 ml) of the model blood (matrix) obtained from three different sources spiked with 1.00 ml of the process solutions 1-7, respectively.

*The reference sample:* a sample (20.00 ml) of the model blood spiked with 1.00 ml of the process solutions 8.

*The solutions to be analysed:* the solutions obtained by the validated method [2] for the model and reference samples.

The absorbance of the solutions to be analysed, model solutions and the reference solution was measured 3 times with taking out the cell at the wavelength of 262 nm by a SF-46 spectrophotometer in the cell with the layer

thickness of 10 mm. As a compensation solution 0.1 mole/l hydrochloric acid solution was used.

### Results and Discussion

Determination of validation characteristics of the UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood was carried out according to the following procedure [3]:

1) the use of the normalized coordinates:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot 100\%, \quad Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot 100\%, \quad Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%; \quad (1)$$

$$C_i = C_{sample}, \quad A_i = A_{sample} - A_{blank},$$

for normalization of the experimental data obtained two approaches were used:

- *Approach 1:* the use of the reference solution with the concentration of doxylamine ( $C_{reference}$ ) corresponding to its concentration in the final spectrophotometric solution measured under the condition of zero losses for the point of 100% in the normalized coordinates:

$$C_{st} = C_{reference}, \quad A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100}; \quad (2)$$

- *Approach 2:* the use of the reference sample with the concentration of doxylamine ( $C_{reference\ sample}$ ) corresponding to its concentration for the point of 100% in the normalized coordinates:

$$C_{st} = C_{reference\ sample}, \quad A_{st} = A_{reference\ sample} - A_{blank}; \quad (3)$$

2) the application range is 25 – 125%, 25 – 150%, 25 – 175%; the mean lethal doxylamine concentration in blood [4] – 25 mg/l (that corresponds to 36 mg/l of doxylamine succinate) was accepted as 100%; the number of concentration levels is  $g = 5, 6$  or  $7$  (depending on the application range chosen) in constant increments of 25%;

3) estimation of linearity, accuracy and repeatability of the method at the first stage was performed using the model solutions within the approach based on assump-



Table 4

Results of accuracy and repeatability determination for UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood without preliminary TLC-purification

Concentration of doxylamine succinate in blood ( $C_{st} = 36$ mcg/ml)	Absorbance $A_i$ ( $A_{blank} = 0.060$ )				Approach 1			Approach 2								
	$C_p$ , mcg/ml	$\bar{X}_p$ , %	1 <sup>st</sup> day	2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	found in % to standard absorbance $Y_p$ , % ( $A_{st} = \frac{A_{reference} \cdot R}{100} = 0.532$ )	$Z_i = \frac{Y_i}{\bar{X}_i} \cdot 100\%$	1 <sup>st</sup> day	2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	found in % to standard absorbance $Y_p$ , % ( $A_{st} = A_{reference\ sample} - A_{blank} = 0.515$ )	$Z_i = \frac{Y_i}{\bar{X}_i} \cdot 100\%$				
10.00	27.78	0.222	0.195	0.205	30.45	25.38	27.26	109.61	91.36	98.13	31.46	26.21	28.16	113.25	94.35	101.37
20.00	55.56	0.368	0.347	0.352	57.89	53.95	54.89	104.19	97.10	98.79	59.81	55.73	56.70	107.65	100.31	102.05
30.00	83.33	0.545	0.526	0.537	91.17	87.59	89.66	109.41	105.11	107.60	94.17	90.49	92.62	113.01	108.59	111.15
40.00	111.11	0.662	0.644	0.654	113.16	109.77	111.65	101.85	98.79	100.49	116.89	113.40	115.34	105.20	102.06	103.81
50.00	138.89	0.795	0.779	0.783	138.16	135.15	135.90	99.47	97.31	97.85	142.72	139.61	140.39	102.76	100.52	101.08
60.00	166.67	0.986	0.970	0.979	174.06	171.05	172.74	104.43	102.63	103.64	179.81	176.70	178.45	107.88	106.02	107.07
65.00	180.56	1.021	1.008	1.015	180.64	178.20	179.51	100.04	98.69	99.42	186.60	184.08	185.44	103.35	101.95	102.70
								104.14	98.71	100.85			$\bar{Z}_s$ , %	107.59	101.97	104.18
								4.12	4.38	3.56			$RSD_{Z_s}$ , %	4.25	4.53	3.68
								8.01	8.51	6.92			$\Delta_{A_{st}}$ , % = $\Delta_Z = RSD_Z \cdot 1.943 \leq 20\%$	8.26	8.80	7.15
								satisfied	satisfied	satisfied			$\delta =  100 - \bar{Z}  \leq 6.40\%$	satisfied	satisfied	satisfied
								4.14	1.29	0.85				7.59	1.97	4.18
								satisfied	satisfied	satisfied				no	satisfied	satisfied
								104.83	98.72	101.08			$\bar{Z}_s$ , %	108.29	101.98	104.42
								4.05	4.79	3.84			$RSD_{Z_s}$ , %	4.19	4.96	3.97
								8.16	9.65	7.74				8.44	9.99	8.00
								satisfied	satisfied	satisfied				satisfied	satisfied	satisfied
								4.83	1.28	1.08				8.29	1.98	4.42
								satisfied	satisfied	satisfied				no	satisfied	satisfied
								104.91	97.93	100.57			$\bar{Z}_s$ , %	108.37	101.17	103.89
								4.52	4.91	4.06			$RSD_{Z_s}$ , %	4.67	5.09	4.19
								9.64	10.47	8.66				9.96	10.85	8.93
								satisfied	satisfied	satisfied				satisfied	satisfied	satisfied
								4.91	2.07	0.57				8.37	1.17	3.89
								satisfied	satisfied	satisfied				no	satisfied	satisfied
													$\delta =  100 - \bar{Z}  \leq 6.40\%$			

$D = 25 - 175\%$   
( $g = 7$ )

$D = 25 - 150\%$   
( $g = 6$ )

$D = 25 - 125\%$   
( $g = 5$ )



Table 5

Results of intermediate precision determination of the UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood without preliminary TLC-purification

Characteristic	Approach 1			Approach 2		
	25 – 125% (g = 5)	25 – 150% (g = 6)	25 – 175% (g = 7)	25 – 125% (g = 5)	25 – 150% (g = 6)	25 – 175% (g = 7)
$\bar{Z}^{intra}, \%$	101.14	101.54	101.23	104.48	104.90	104.58
$RSD_Z^{intra}, \%$	4.51	4.25	4.03	4.67	4.39	4.17
$\Delta_Z^{intra}, \% = t(95\%, 3g - 1) \cdot RSD_Z^{intra} \leq 20\%$	7.94	7.39	6.95	8.23	7.64	7.19
	satisfied	satisfied	satisfied	satisfied	satisfied	satisfied

tion of insignificance of the uncertainty of the analyte quantitative determination in model solutions  $\Delta_{As}^{model}$  in comparison with the complete uncertainty of the analysis results  $\Delta_{As}$ , according to the acceptability criteria calculated for the residual standard deviation  $RSD_0^{model}$ , absolute term  $a^{model}$  and correlation coefficient  $R_c^{model}$  for the variants of the method application range offered, as well as to the requirements to accuracy and repeatability ( $\delta^{model} \leq 2.05\%$  and  $\Delta_{As}^{model} \leq 6.40\%$ );

4) at the second stage determination of linearity, accuracy, repeatability and intermediate precision of the method was performed on the model samples prepared using the matrix for three parallel runs; within each run the values of the linearity parameters, values  $\delta$  and  $\Delta_Z$  were determined and compared with the calculated critical values –  $\max RSD_0$ ,  $\max a$ ,  $\min R_c$ ,  $\max \delta$  and  $\max \Delta_Z$ ;

for verification of intermediate precision the pooled mean value  $\bar{Z}^{intra}$ , the pooled relative standard deviation  $RSD_Z^{intra}, \%$  and the relative confidence interval  $\Delta_Z^{intra}, \%$  were calculated for three runs obtained; the value  $\Delta_Z^{intra}, \%$  should not exceed the extreme uncertainty of analysis  $\max \Delta_{As}$ :

$$\Delta_Z^{intra} = t(95\%, 3g - 1) \cdot RSD_Z^{intra} \leq \max \Delta_{As}. \quad (4)$$

The results of linearity, accuracy and repeatability determination of the UV-spectrophotometric method of

doxylamine quantitative determination using the model solutions are given in Tab. 1 and 2.

The results of linearity, accuracy, repeatability and intermediate precision determination of the UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination using the model samples are given in Tab. 3, 4 and 5.

The data from Tab. 1-5 are the evidence that the method of standard can be applied for UV-spectrophotometric determination of doxylamine in blood; thus, the requirements offered to the validation parameters are completely performed only in the case of using *Approach 1*.

#### CONCLUSIONS

The procedure of determination and acceptability estimation of linearity, accuracy and precision offered previously [3] for validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination of analytes in biological fluids used in forensic and toxicological analysis in the variant of the method of standard has been tested by the example of the UV-spectrophotometric method of doxylamine quantitative determination in blood. It has been shown that *Approach 1* based on the use of the reference sample with the concentration of doxylamine corresponding to its concentration for the point of 100% in the normalized coordinates for normalization of absorbance values is more acceptable.

#### REFERENCES

1. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: В 3-х т. / Под ред. чл.-кор. НАН Украины В.П.Георгиевского. – X.: НТМТ, 2011. – Т. 3. – 520 с.
2. Клименко Л.Ю., Трут С.Н., Петюнин Г.П., Иванчук И.М. // Укр. журн. клін. та лаборатор. медицини. – 2013. – Т. 8, №4. – С. 191-199.
3. Клименко Л.Ю. // Фармація Казахстана. – 2014. – №4. – С. 42-48.
4. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / Ed. by A.C.Moffat, M.D.Osselson, B.Widdop. – 4<sup>th</sup> ed. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
5. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2001. – 22 p.
6. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens / United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section. – New York: United Nations, 2009. – 70 p.

7. *Guideline on Bioanalytical Method Validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 p.*
8. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (draft) / Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). – 2012. – 52 p.*

---

**ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСИЛАМІНУ В КРОВІ У ВАРІАНТІ МЕТОДУ СТАНДАРТУ**

**Л.Ю.Клименко, С.М.Трут, С.М.Полуян**

**Ключові слова:** валідація; біоаналітичні методуки; УФ-спектрофотометрія; доксиламін; метод стандарту

З метою раціоналізації проведення кількісних визначень в судово-токсикологічному аналізі вивчена можливість використання методу стандарту при проведенні УФ-спектрофотометричного визначення аналітів у біологічних рідинах. Запропоновано процедуру визначення та оцінки прийнятності лінійності, правильності та прецизійності для валідації таких методик у варіанті методу стандарту, що апробовано на прикладі УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення доксиламіну в крові. Запропонована процедура передбачає використання нормалізованих координат – для нормалізації отриманих експериментальних даних використано два підходи. 1) Підхід 1: використання розчину порівняння з концентрацією аналіту, що відповідає його концентрації в кінцевому спектрофотометрованому розчині за умови нульових втрат для точки 100% в нормалізованих координатах. 2) Підхід 2: використання зразка порівняння з концентрацією аналіту, що відповідає його концентрації для точки 100% в нормалізованих координатах. Оцінку лінійності, правильності і збіжності методики на першому етапі виконували з використанням модельних розчинів у рамках підходу, що ґрунтується на припущенні незначущості невизначеності кількісного визначення аналіту в модельних розчинах  $\Delta_{As}^{model}$  у порівнянні з повною невизначеністю результатів аналізу  $\Delta_{As}$ . На другому етапі проводили визначення лінійності, правильності, збіжності і внутрішньолабораторної прецизійності методики на модельних зразках, приготованих з використанням матриці, для трьох паралельних послідовностей. Показано, що для УФ-спектрофотометричного визначення доксиламіну в крові можна застосовувати метод стандарту – при цьому більш прийнятним є Підхід 1.

---

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСИЛАМИНА В КРОВИ В ВАРИАНТЕ МЕТОДА СТАНДАРТА**

**Л.Ю.Клименко, С.Н.Трут, С.М.Полуян**

**Ключевые слова:** валідація; біоаналітичні методуки; УФ-спектрофотометрія; доксиламін, метод стандарту

С целью рационализации проведения количественных определений в судебно-токсикологическом анализе изучена возможность использования метода стандарта при проведении УФ-спектрофотометрического определения аналитов в биологических жидкостях. Предложена процедура определения и оценки приемлемости линейности, правильности и прецизионности для валидации таких методик в варианте метода стандарта, которая апробирована на примере УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови. Предложенная процедура предполагает использование нормализованных координат – для нормализации полученных экспериментальных данных использованы два подхода. 1) Подход 1: использование раствора сравнения с концентрацией аналита, соответствующей его концентрации в конечном спектрофотометрируемом растворе при условии нулевых потерь для точки 100% в нормализованных координатах. 2) Подход 2: использование образца сравнения с концентрацией аналита, соответствующей его концентрации для точки 100% в нормализованных координатах. Оценку линейности, правильности и сходимости методики на первом этапе выполняли с использованием модельных растворов в рамках подхода, основанного на предположении незначимости неопределенности количественного определения аналита в модельных растворах  $\Delta_{As}^{model}$  по сравнению с полной неопределенностью результатов анализа  $\Delta_{As}$ . На втором этапе проводили определение линейности, правильности, сходимости и внутрिलाбораторной прецизионности методики на модельных образцах, приготовленных с использованием матрицы, для трех параллельных последовательностей. Показано, что для УФ-спектрофотометрического определения доксиламина в крови можно применять метод стандарта – при этом более приемлемым является Подход 1.

Recommended by Doctor of Pharmacy, professor A.G.Serbin

UDC 615.322:581.949.135.51:581.44/.45:581.145.1

## THE STUDY OF THE VOLATILE OILS COMPOSITION OBTAINED FROM VEGETATIVE AND GENERATIVE ORGANS OF *BALLOTA NIGRA* L.

Yana S. Kolisnyk, Alla M. Kovaleva, Olga V. Goryacha

National University of Pharmacy

*Key words: black horehound; Ballota nigra; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); volatile oil component composition*

The article presents the data of the pharmacognostic study of the aerial part of black horehound (*Ballota nigra* L.). The aim of the work is to determine the qualitative composition and the quantitative content of the volatile components from vegetative and generative organs of black horehound. Leaves, flowers and stems of black horehound were harvested at the flowering phase in the Kharkiv region. For the first time volatile compounds of black horehound aerial parts have been investigated by GC/MS. The component composition of volatile substances in horehound herb has been studied using an Agilent Technologies 6890N chromatograph with a mass spectrometry detector 5973N. The components have been identified according to mass spectra NIST 05 and WILEY 2007 libraries together with the programmes for identifying AMDIS and NIST. In vegetative and generative organs of horehound 48 components have been identified. Germacrene D (40.2 mg/kg), hexahydrofarnesylacetone (167.42 mg/kg), 2,6-trimethyl-4-methylene-2H-pyran (172.3 mg/kg), myristic (271.3 mg/kg), pentadecanoic (182.1 mg/kg), palmitoleic (306.4 mg/kg) and palmitic (1620.6 mg/kg) acids prevail in vegetative organs. Farnesylacetone (68.8 mg/kg), verbenone (35.7 mg/kg), myristic (187.5 mg/kg), palmitic acid (656.5 mg/kg) and palmitoleic (196.9 mg/kg) acids are the major components in generative organs. Therefore, hexahydrofarnesylacetone, palmitic and palmitoleic acids, and 2,6-trimethyl-4-methylene-2H-pyran are predominant components in the raw material studied.

Black horehound (*Ballota nigra*, *Lamiaceae* family) is a perennial herb, widely spread in Russia, Ukraine, in the countries of Western Europe, North Africa and the Caucasus [2]. The plant is not officinal, but is used in folk medicine as a sedative. In the aerial part of black horehound such diterpenoids as marrubin, ballonigrin, ballotinone, ballotenol, 7-acetoxymarrubin have been studied. The glycoside forms of phenylpropanoids – verbascoside, phorsitoside, arenarioside, ballotetroside, allisonoside, lavandulifolioside, angoroside and the non-glycoside forms – (+)-(E)-coffeoyl-L-malic acid have been found [3, 7, 9, 10]. Recent studies have determined that biologically active substances (BAS) of black horehound possess nootropic, anti-oxidant, anti-arrhythmic, anti-microbial and antihypoxia activities [2, 4-6, 8]. Therefore, expedience of the comprehensive study of BAS of black horehound is an urgent question for pharmacy.

Earlier studies have shown the presence of flavonoids, tannins, iridoids, essential oil, hydroxycinnamic acid and phenol carboxylic acids in flowers (calyx, corollas), stems and leaves of black horehound [1].

The aim of this work was to study the components of essential oil of *Ballota nigra* by chromat-mass spectrometry.

The object of the study was samples of air-dried herb: leaves, flowers and stems of black horehound harvested at the flowering stage in the summer of 2013 in the neighbourhood of Kharkov.

### Materials and Methods

The analysis of the essential oil of black horehound leaves and flowers was performed using a chromat-mass spectrometer Agilent Technology HP6890 GC with a mass spectrometric detector 5973N.

A weighed portion of the crushed raw material (1.0 g) was placed in a 20 ml "Agilent" vial, to which the internal standard (50 µg of tridecane) and 10 ml of water were added. Volatile components of the sample were steamed for 2 hours using a reflux condenser with air cooling. Substances adsorbed on the inner surface of the reflux after cooling of the system were washed into a dry 10 ml vial by slow adding of 3 ml of ultrapure pentane. The washes were concentrated by blowing (100 ml/min) with ultrapure nitrogen until the residual volume of the extract was 10 µl, then it was completely withdrawn by a chromatographic syringe. The further concentration of the sample to the volume of 2 ml was carried out in the syringe. The injection of the sample was performed in a splitless mode; it allowed to introduce the sample without division loss and significantly (10-20 fold) increase sensitivity of the chromatographic process. The input sample rate was 1.2 ml/min for 0.2 minutes. The chromatographic conditions were as follows: capillary chromatographic column DB-5 (30 m×0.25 mm); the carrier gas – helium, the carrier gas speed – 1.2 ml/min; the thermostat temperature – from 50 to 320°C at the rate of 4 °/min; the heater temperature of the sample introduction – 250°C. From the aqueous extract vola-

Table

## The component composition of vegetative and generative organs of black horehound

Retention time, min	Compound	Corollas, mg/kg	Calyx, mg/kg	Leaves, mg/kg	Stems, mg/kg
5.31	Benzaldehyde	3.9	–	–	5.1
6.26	1-Octen-3-ol	3.5	–	–	10.4
6.54	2,3,5-Trimethylpyrazine	–	–	–	7.9
6.68	Octanal	–	10.9	–	–
7.4	Phenylacetaldehyde	9.3	–	31.3	–
7.49	Benzyl alcohol	–	–	–	9.8
7.79	Limonene	–	10.3	–	–
9.01	Tetramethylpyrazine	–	–	–	26.5
9.17	2,5-Dimethyl-3-acetylfurane	5.1	–	–	–
9.69	Nonanal	–	21.5	–	–
9.74	Linalool	4.9	–	–	–
10.04	2,2,6-Trimethyl-4-methylene-2H-pyran	172.3	–	14.9	42.5
11.07	Verbenol	–	–	–	7.1
12.34	Methylsalicylate	4.6	–	–	313
12.49	$\alpha$ -Terpineol	4	–	–	6.2
12.64	Verbenone	–	–	35.7	3.2
12.99	Decanal	8.9	71	27.1	–
14.59	Isopiperitenone	–	8.7	–	–
14.84	Ethylsalicylate	–	–	–	7.6
16.17	4-Vinyl-2-methoxyphenol	–	–	–	36.1
16.31	Dodecanal	–	519	–	–
17.58	Eugenol	26.3	–	12.2	18.9
18.76	Caprylic acid	39	–	–	–
18.98	Methyleugenol	26.3	39.6	12.8	–
20.04	$\beta$ -Caryophyllene	26.8	–	–	2
20.75	Geranylacetone	8.6	10.9	12.5	3.8
21.03	Gumulene	11.3	–	–	2.2
21.53	$\beta$ -Ionone-epoxyside	–	–	36.4	5.4
21.63	$\beta$ -Ionone	–	–	–	3.3
21.83	Germacrene D	40.2	–	–	8.2
21.89	Tetradecane	–	6.8	–	–
22.09	Dihydroactinidiolide	–	–	43.8	–
22.94	Pentadecane	–	53.9	–	–
23.47	Elemicin	–	14	–	–
23.66	Elemol	18.5	–	–	–
24.39	Spatulenol	15.4	–	–	–
24.48	Caryophyllene oxide	57.1	–	–	6.8
24.56	Lauric acid	–	67.1	–	–
25.19	Benzophenone	–	11.7	–	–
26.07	<i>Trans</i> -isoelemicin	–	67.1	–	–
28.6	11-Tetradecenic acid	–	–	–	4.9
29.05	Miristic acid	100.6	271.3	187.5	41.9
29.97	Farnesole	–	–	32.2	–
30.27	Hexahydrofarnesylacetone	167.4	60.3	–	–
30.62	Pentadecanoic acid	50.7	182.1	121.8	–
31.19	Farnesylacetone	–	–	68.8	–
31.71	Palmitoleic acid	44.5	306.4	196.9	34.7
32.2	Palmitic acid	573.9	1620.6	656.5	130.9

tile compounds were extracted with methylene chloride and further analyzed as described above.

Substances were identified by comparison of the mass spectra obtained with the data from mass spectra libraries NIST05 and WILEY 2007 in combination with the programmes for identification AMDIS and NIST. The content of components in the herbal drug (mg/kg) is given in Table.

### Results and Discussion

Qualitative and quantitative compositions of essential oils of various organs of horehound are given in mg/kg (Table). As the result of the research 48 components of essential oil have been identified and quantified in generative and vegetative organs. Quantitatively sesquiterpenoids and substances of different origin (aldehydes, hydrocarbons, and fatty acids) are predominant, in smaller concentration monoterpenoids and aromatic compounds have been found. Germacrene D (40.2 mg/kg),

hexahydrofarnesylacetone (167.42 mg/kg), 2,6-trimethyl-4-methylene-2H-pyran (172.3 mg/kg), myristic (271.3 mg/kg), pentadecanoic (182.1 mg/kg), palmitoleic (306.4 mg/kg) and palmitic (1620.6 mg/kg) acids prevail in vegetative organs. Farnesylacetone (68.8 mg/kg), verbenone (35.7 mg/kg), myristic (187.5 mg/kg), palmitic acid (656.5 mg/kg) and palmitoleic (196.9 mg/kg) acids are the major components in generative organs.

### CONCLUSIONS

1. The Chromato-mass spectrometric research of volatile substances of vegetative and generative organs of black horehound has been carried out; 48 components have been identified and quantified.

2. The predominant components in the raw material studied are hexahydrofarnesylacetone, palmitic acid, palmitoleic acid and 2,6-trimethyl-4-methylene-2H-pyran.

3. The results obtained will be used for further phytochemical research of these herbal drugs.

### REFERENCES

1. Ковалева А.М., Колесник Я.С., Седова А.Б. // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом: Матер. научно-практ. конф. с междунар. участием (21-23 ноября 2013 года). – 2013. – №11. – С. 76-78.
2. Круглая А.А., Тираспольская С.Г., Алфимова Г.В. и др. // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т. 14, №5(3). – С. 726-730.
3. Bertrand M., Tillequin F., Bailleul F. // *Biochemical Systematics and Ecol.* – 2001. – Vol. 28 (10). – P. 1031-1033.
4. Çitoğlu G., Coban T., Sever B. et al. // *J. of Ethnopharmacol.* – 2004. – Vol. 92 (2-3). – P. 275-280.
5. Çitoğlu G., Özbek H., Sever B. // *Eastern J. of Medicine.* – 2005. – Vol. 10. – P. 24-28.
6. Dulger B., Sener A. // *African J. of Microbiol. Res.* – 2010. – Vol. 4 (12). – P. 1235-1238.
7. Enikő T., Gábor J., Imre M. et al. // *J. of Planar Chromatography – Modern TLC.* – 2009. – Vol. 22 (4). – P. 293-296.
8. Ezer N., Şahin F., Toker M. // *Israel J. of Plant Sci.* – 1999. – Vol. 47 (1). – P. 43-48.
9. Sahpaz S., Skaltsounis A.L., Bailleul F. // *Biochem. Syst. Ecol.* – 2002. – Vol. 30. – P. 601-604.
10. Sever B. *The investigation of diterpenoid and flavonoid contents of Ballota species growing in Turkey.* – PhD Thesis. – Ankara, 2002. – 134 p.

### ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ВЕГЕТАТИВНИХ І ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНІВ *BALLOTA NIGRA* L.

Я.С.Колісник, А.М.Ковальова, О.В.Горяча

**Ключові слова:** М'яточник чорний; *Ballota nigra* L.; хромато-мас-спектрометрія; компонентний склад ефірної олії

Наведені дані фармакогностичного вивчення надземної частини м'яточника чорного (*Ballota nigra* L.). Метою роботи є визначення якісного складу та кількісного вмісту летких компонентів вегетативних та генеративних органів м'яточника чорного. В якості сировини використовували листя, квітки і стебла, заготовлені в фазу цвітіння в Харківській області. Вперше методом хромато-мас-спектрометрії проведено дослідження летких речовин надземної частини м'яточника чорного. У вегетативних та генеративних органах м'яточника ідентифіковано 48 компонентів. У вегетативних органах переважають гермакрен D (40,2 мг/кг), гексагідрофарнезилацетон (167,42 мг/кг), 2,6-триметил-4-метилен-2H-піран (172,3 мг/кг), міристинова (271,3 мг/кг), пентадеканова (182,1 мг/кг), пальмітолеїнова (306,4 мг/кг) і пальмітинова кислоти (1620,6 мг/кг). У генеративних органах рослини переважають фарнезилацетон (68,8 мг/кг), вербенон (35,7 мг/кг), міристинова (187,5 мг/кг), пальмітинова (656,5 мг/кг) і пальмітолеїнова (196,9 мг/кг) кислоти. Домінуючими компонентами у досліджуваній сировині є гексагідрофарнезилацетон, пальмітинова та пальмітолеїнова кислоти, а також 2,6-триметил-4-метилен-2H-піран.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЭФИРНОГО МАСЛА ВЕГЕТАТИВНЫХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНОВ *BALLOTA NIGRA* L.****Я.С.Колесник, А.М.Ковалева, О.В.Горячая****Ключевые слова:** Белокудренник черный; *Ballota nigra* L.; хромато-масс-спектрометрия; компонентный состав эфирного масла

Приведены данные фармакогностического изучения надземной части белокудренника черного (*Ballota nigra* L.). Целью работы было определение качественного состава и количественного содержания летучих компонентов вегетативных и генеративных органов белокудренника черного. В качестве сырья использовали листья, цветки и стебли, заготовленные в фазу цветения в Харьковской области. Впервые методом хромато-масс-спектрометрии проведено исследование летучих веществ надземной части белокудренника черного. Компонентный состав летучих веществ травы белокудренника исследовали на хроматографе Agilent Technologies 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973N. Компоненты идентифицировали с помощью библиотеки масс-спектров NIST 05 и WILEY 2007 совместно с программами для идентификации AMDIS и NIST. В вегетативных и генеративных органах белокудренника идентифицировано 48 компонентов. В вегетативных органах преобладают гермакрен D (40,2 мг/кг), гексагидрофарнезилацетон (167,42 мг/кг), 2,6-триметил-4-метилен-2H-пиран (172,3 мг/кг), миристиновая (271,3 мг/кг), пентадекановая (182,1 мг/кг), пальмитолеиновая (306,4 мг/кг) и пальмитиновая кислоты (1620,6 мг/кг). В генеративных органах растения преобладают фарнезилацетон (68,8 мг/кг), вербенон (35,7 мг/кг), миристиновая (187,5 мг/кг), пальмитиновая (656,5 мг/кг) и пальмитолеиновая (196,9 мг/кг) кислоты. Доминирующими компонентами в исследуемом сырье являются гексагидрофарнезилацетон, пальмитиновая и пальмитолеиновая кислоты, а также 2,6-триметил-4-метилен-2H-пиран.

# ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЕКОНОМІКА ФАРМАЦІЇ

*Recommended by Candidate of Pharmacy, associate professor V.V.Maliy*

UDC 615.322:615.244:339.138

## MARKETING RESEARCH OF THE MARKET OF DRUGS WITH THE CHOLERETIC ACTION

L.O.Bobritskaya, M.A.Arakelyan, N.V.Popova

National University of Pharmacy

*Key words: cholelithiasis; marketing research; choleretic drugs; medicinal forms*

*Literary sources indicate that among hyperendemic diseases the problems of the biliary system take one of the leading places and are widely represented in all age groups. According to the Centre for Health Statistics of the Ministry of Public Health of Ukraine the number of patients with cholelithiasis grows, the increase in its prevalence for the last 10 years is 97.5%. The primary cause of the disease is the human life style, as well as conditions and the environment, genetic predisposition and activities of healthcare institutions. More often the treatment of cholelithiasis is associated with hospitalization and high financial cost. Annually there are more than 2.5 million operations on the bile ducts in the world. One of the alternative methods of treatment involves the use of drugs that are of natural and synthetic origin. Nowadays herbal medicines are gaining popularity. Prepared from herbs phytodrugs have a wide range of the therapeutic action with gradual, slow development of the therapeutic effect, high bioavailability, and patients can use them for a long time. Their action is not only aimed directly at treating disease, but also protecting and strengthening the organism as a whole. The aim of our work is to conduct the marketing research of the market of drugs with the choleretic action. It has been shown that the majority of the choleretic drugs range is formed by foreign producers, their share is 62% and domestic drugs are 38%. The countries importing drugs of the group under research have been studied. It has been proven that among the drugs with the choleretic action, tablets are the most common dosage form, their share is 55%. The results of the marketing analysis conducted allows to prove the expedience of creating combined medicinal products based on the plant raw material with a wide range of the therapeutic action that will have a high efficiency, quality and availability to the general public.*

At present, diseases of the biliary system take one of the leading places among hyperendemic diseases and are widely represented in all age groups. The prevalence of the disease is 45%, among young people it is 43% [2, 3, 16, 18].

Foreign researchers have noted that in Europe and North America approximately 15% of the population suffer from cholecystitis [11, 7, 12].

In Ukraine, according to the Centre for Health Statistics of the Ministry of Public Health of Ukraine the number of patients with cholelithiasis grows, the increase in its prevalence for the last 10 years is 97.5%.

Prevalence of cholelithiasis is due to the factors that affect development of this disease (Fig. 1).

Fig. 1 shows that the main cause of the disease is the human life style, as well as conditions and the environment, genetic predisposition and activities of healthcare institutions.

More often the treatment of cholelithiasis is associated with hospitalization and high financial cost.

Annually there are more than 2.5 million operations on the bile ducts in the world.

The basis of the disease is metabolic disorders, cholestasia in the gallbladder and inflammation. Therefore,

in order to prevent the symptoms of the disease an alternative method of treatment that involves administration of drugs is used [4, 15]. These drugs are both of natural and synthetic origin. According to the literature it is known that synthetic drugs may produce hepatotoxic effects and the possibility of developing dysbacteriosis [9, 10]. Synthetic drugs have also the limited range of the pharmacological action compared to phytodrugs.

Nowadays herbal medicines are gaining popularity. Phytodrugs prepared from herbs have a wide range of the therapeutic action with gradual, slow development of the therapeutic effect, high bioavailability, and patients can use them for a long time. Their action is not only aimed directly at treating disease, but also protecting and strengthening the organism as a whole [6, 14].

The aim of our work is to conduct the marketing research of the market of drugs with the choleretic action.

Based on the literary sources it is known that there is a classification of choleretics [8, 19] (Tab. 1).

Most drugs for cholelithiasis are represented by medicines of foreign production (Fig. 2). Their share is 62%. Domestic drugs are 38% of the range studied [5].

Foreign drugs are presented by 8 countries at the Ukrainian pharmaceutical market. Foreign manufacturers

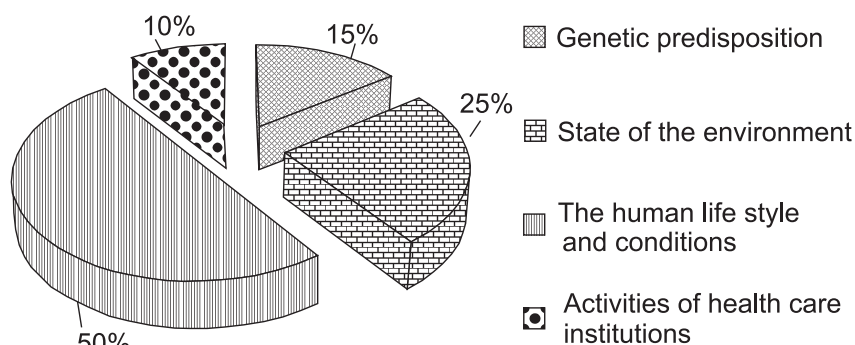


Fig. 1. Factors of cholelithiasis appearance.

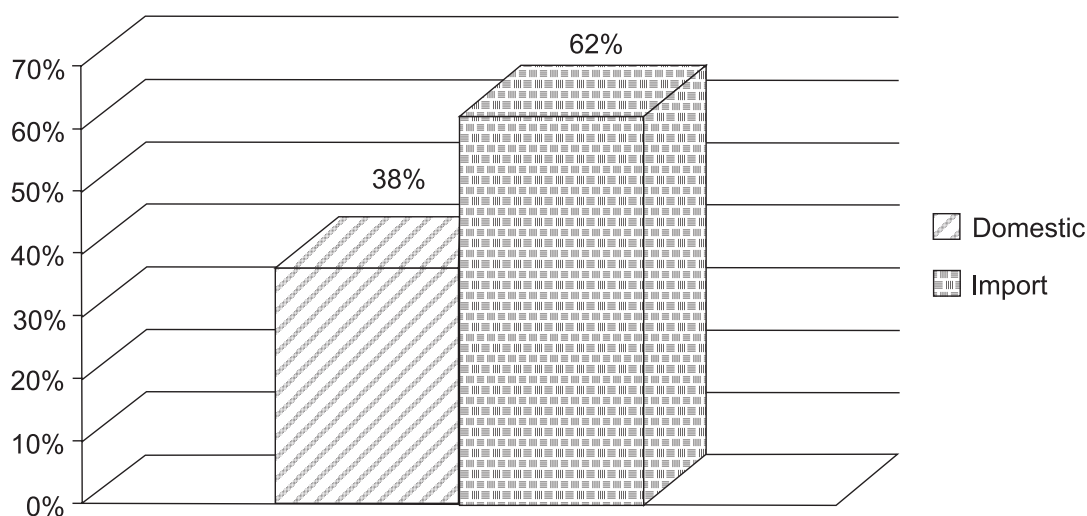


Fig. 2. The ratio between domestic and foreign choleretic drugs.

Table

## Classification of choleretic drugs

I. DRUGS THAT STIMULATE THE BILE FORMATION – CHOLERETICS		II. DRUGS THAT STIMULATE THE BILE SECRETION	
<b>A.</b> Intensifying the bile secretion and creating bile acids (true choleretics)	<b>B.</b> Drugs that increase the bile secretion by the aqueous component (hydrocholeretics)	<b>A.</b> cholekinetics – increase the tone of the gallbladder and decrease the tone of the bile ducts	<b>B.</b> cholelitholytics – cause relaxation of the biliary tract
<b>1) Drugs containing bile acids:</b> Alochol, Holenzym, Choliver, etc. <b>2) Synthetic drugs:</b> hydroxymethylnicotinamide (Nicodin) osalmide (Oxaphenamid), cyclovalone (Cycvalon) hymecromone (Odeston, Holonerton, Holestil) <b>3) Herbal products:</b> immortelle flowers (Flamin), artichoke extract (Artihol, Bilikur, Chophytol) corn stigmas, common tansy (Tanacechol), rosehips (Cholosas), berberine bisulfate, birch buds, cornflower flowers, oregano herb, sweet flag oil, terpentine oil, peppermint oil and others	Mineral water, sodium salicylate, drugs of valerian	cholecystokinin, magnesium sulfate, pituitrin, choleritin, drugs of barberry, sorbitol, mannitol, xylitol	atropine, platifillin, metocinium iodide (Metacin), belladonna extract, papaverine, drotaverine (No-spa), mebeverine (Duspatalin), aminophylline, Olimetin



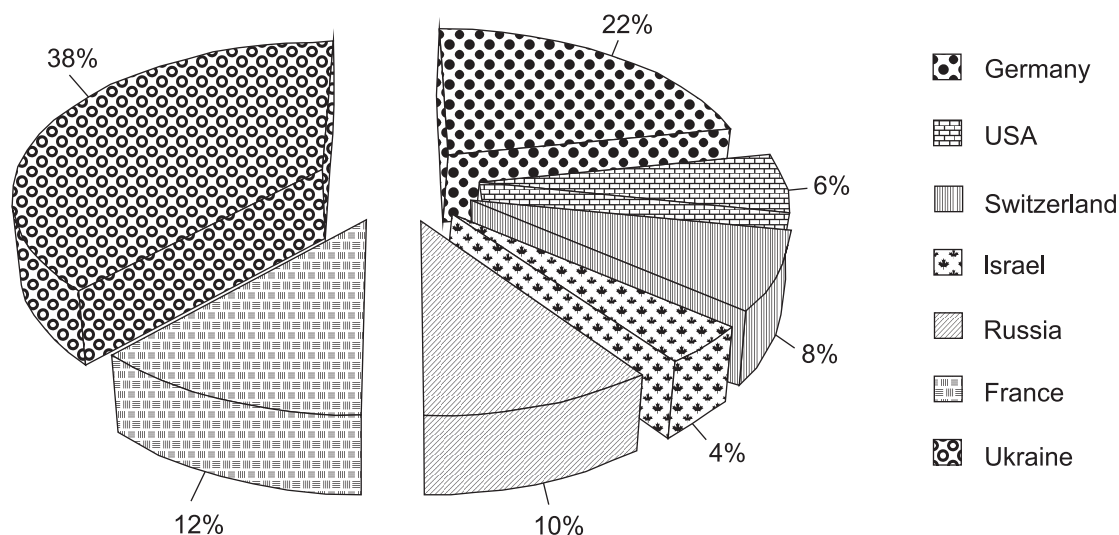


Fig. 3. Distribution of choleric drugs by manufacturing countries.

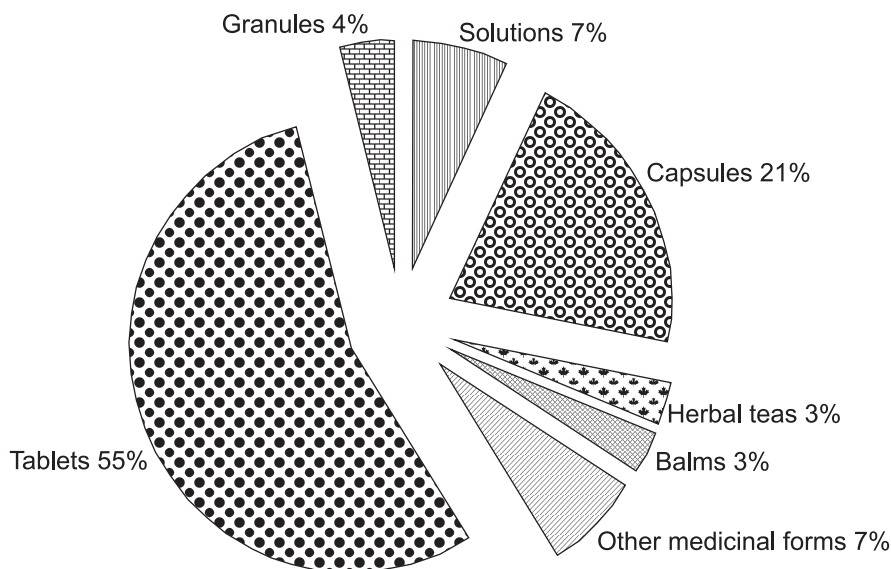


Fig. 4. The ratio of medicinal forms of choleric drugs.

are presented by such countries as Germany, the USA, Switzerland, Israel, Russia, France, Austria and China (Fig. 3).

Fig. 4 presents the marketing analysis of the choleric drugs range according to the dosage forms.

Taking into account the results of the marketing research (Fig. 4), it has been found that the largest share is drugs with the choleric action in the form of tablets (55%), half as large is in the form of capsules (21%), then there are solutions (7%), granules, teas, balms. The analysis shows the monocomponent composition of these medicines.

Popularity of manufacturing tablets is due to a number of their well-known advantages over other dosage forms: ease of use and storage, accuracy of dosing, the ability to combine medicinal substances incompatible by physical and chemical properties, and therapeutic effect, portability, etc. [1, 13, 17].

The results of the marketing analysis conducted allows to prove the expedience of creating combined me-

dicinal products based on the plant raw material with a wide range of the therapeutic action that will have a high efficiency, quality and availability to the general public.

#### CONCLUSIONS

1. The marketing research of the pharmaceutical market of drugs with the choleric action has been carried out.

2. It has been shown that the majority of the choleric drugs range is formed by foreign producers, their share is 62% and domestic drugs are 38%.

3. The countries importing drugs of the group under research have been studied.

4. It has been proven that among the drugs with the choleric action, tablets are the most common dosage form, their share is 55%.

5. The expedience of creating domestic drugs with the choleric action has been substantiated in order to increase the level of providing the population with effective, safe and available drugs.

## REFERENCES

1. Залиская О.Н., Парновский Б.Л. // *Провизор*. – 2000. – №13. – С. 32-34.
2. Ильченко А.А. // *II Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2002. – Т. XII, №5. – С. 99.
3. Ипатов Ю.П. Рентгенологическое и эзографическое исследование желчных путей. Текст // *Билиарная патология у детей: Сб. науч. трудов.* – Москва – Казань, 1993. С. 23-37.
4. *Клінічна фармакологія: підруч.* / За ред. О.Я.Бабака, О.М.Біловола, І.С.Чекмана. – К.: Медицина, 2008. – С. 323-353.
5. Кононова С.В., Олейник Г.А. // *Новая аптека*. – 2003. – №6. – С. 25-30.
6. Коттлер Ф.П., Армстронг Г.Л., Сондерс Д.Т. *Основы маркетинга*. – К.: ИД «Вильямс», 2000. – 944 с.
7. Лозовая Г.Ф. *Менеджмент фармацевтической организации*. – М.: МЦФЭР, 2000. – 192 с.
8. Лоскутова Е.Е. // *Рос. АПТЕКИ*. – 2002. – №4. – С. 39-43.
9. Пастушенков Л.В., Лесиовская Е.Е. *Фармакотерапия с основами фитотерапии: учеб. в 2-х ч.* – С.Пб., 1995.
10. Самура Б.А., Бабак О.Я., Колесник Ю.М. и др. *Фармакотерапия: учеб. для студ. фармац. вузов и ф-тов высш. мед. учеб. заведений.* – 2-е изд., перераб. и доп. / Под ред. Б.А.Самуры. – Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2007. – 720 с.
11. Bartoli E., Capron J. // *Rev. Prat.* – 2000. – №50. – P. 2112-2116.
12. Chebif M., Ferrari Junior A.P., Silva M.R. et al. // *II Arg. Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 37 (2). – P. 93-101.
13. Colovic R., Milosavjevic T., Zogovic S. // *Acta Chir. Jugosl.* – 2001. – Vol. 48 (1). – P. 65-69.
14. Portsncasa P., Moschetta A., Palasciano G. // *Lancet.* – 2006. – №368. – P. 230-239.
15. Qualich L.G., Stern M.A., Rich M. et al. // *Gastrointest. Endosc.* – 2002. Vol. 55 (2). – P. 163-166.
16. Rawat B., Loewy J. // *Can. Assoc. Radiol. J.* – 1996. – Vol. 106, №98. – P. 265-269.
17. Stagnitti F., Mongardini M., Schiacci F. et al. // *G. Chin.* – 2000. – Vol. 21 (3). – P. 110-117.
18. Todoroki I., Fridman G.D., Sattery M.L. et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 1999. – Vol. 94. – P. 41-46.
19. Tocchi A., Costa G., Lepre L. et al. // *G. Chin.* – 1999. – Vol. 20 (11-12). – P. 474-478.

**МАРКЕТИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ РИНКУ ПРЕПАРАТІВ ЖОВЧОГІННОЇ ДІЇ****Л.О.Бобрицька, М.А.Аракелян, Н.В.Попова****Ключові слова:** жовчокам'яна хвороба; маркетингові дослідження; препарати жовчогінної дії; лікарські форми

Літературні джерела свідчать, що серед гіперендемичних хвороб захворювання жовчовивідної системи посідають одне з провідних місць та широко представлені в усіх вікових групах. За даними центру медичної статистики МОЗ в Україні відбувається збільшення кількості хворих на жовчокам'яну хворобу (ЖКХ), прискіп поширеності за 10 років дорівнює 97,5%. Головною причиною виникнення захворювання є образ і умови життя людини, а також стан навколишнього середовища, генетична схильність та діяльність закладів охорони здоров'я. Найчастіше лікування ЖКХ пов'язане з госпіталізацією та високими фінансовими витратами. Щорічно в світі здійснюється понад 2,5 млн операцій на жовчовивідних шляхах. Один із альтернативних способів лікування включає застосування лікарських препаратів, які представлені природними та синтетичними лікарськими засобами. На сьогоднішній день рослинні препарати набувають все більшої популярності. Виготовлені з лікарських трав фітопрепарати мають широкий спектр лікувальної дії з поступовим повільним розвитком терапевтичного ефекту, високу біодоступність, можуть застосовуватись пацієнтами впродовж тривалого часу. Їх дія спрямована не тільки безпосередньо на лікування хвороби, а й на захист і зміцнення організму в цілому. Метою нашої роботи є проведення маркетингового дослідження ринку лікарських препаратів жовчогінної дії. Були проведені маркетингові дослідження фармацевтичного ринку препаратів жовчогінної дії. Показано, що більшість асортименту жовчогінних препаратів формується за рахунок іноземних виробників, на їх частку припадає 62%, а на вітчизняні – 38%. Встановлені країни-імпортери препаратів досліджуваної групи. Доведено, що серед препаратів жовчогінної дії найбільш поширеною лікарською формою є таблетки, їх частка складає 55%. Результати проведеного маркетингового аналізу дозволили обґрунтувати доцільність створення комбінованих лікарських засобів на основі рослинної сировини з широким спектром лікувальної дії, які матимуть високу ефективність, якість та доступність для широких верств населення.

**МАРКЕТИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЫНКА ПРЕПАРАТОВ ЖЕЛЧЕГОННОГО ДЕЙСТВИЯ****Л.А.Бобрицкая, М.А.Аракелян, Н.В.Попова***Ключевые слова: желчекаменная болезнь; маркетинговые исследования; препараты желчегонного действия; лекарственные формы*

*Литературные источники свидетельствуют о том, что среди гиперэндемических болезней заболевания желчевыводящей системы занимают одно из ведущих мест и широко представлены во всех возрастных группах. По данным центра медицинской статистики Минздрава в Украине, происходит увеличение количества больных с желчекаменной болезнью (ЖКБ), прирост распространенности за 10 лет составляет 97,5%. Главной причиной возникновения заболевания является образ и условия жизни человека, а также состояние окружающей среды, генетическая предрасположенность и деятельность учреждений здравоохранения. Чаще всего лечение ЖКБ связано с госпитализацией и высокими финансовыми затратами. Ежегодно в мире производится более 2,5 млн операций на желчевыводящих путях. Один из альтернативных способов лечения включает применение лекарственных препаратов, которые представлены природными и синтетическими лекарственными средствами. На сегодняшний день растительные препараты приобретают все большую популярность. Изготовленные из лекарственных трав фитопрепараты имеют широкий спектр лечебного действия с постепенным медленным развитием терапевтического эффекта, высокую биодоступность, могут применяться пациентами в течение длительного времени. Их действие направлено не только непосредственно на лечение болезни, но и на защиту и укрепление организма в целом. Целью нашей работы является проведение маркетингового исследования рынка лекарственных препаратов желчегонного действия. Были проведены маркетинговые исследования фармацевтического рынка препаратов желчегонного действия. Показано, что большинство ассортимента желчегонных препаратов формируется за счет иностранных производителей, на их долю приходится 62%, а отечественные занимают 38%. Установлены страны-импортеры препаратов исследуемой группы. Доказано, что среди препаратов желчегонного действия наиболее распространенной лекарственной формой являются таблетки, их доля составляет 55%. Результаты проведенного маркетингового анализа позволили обосновать целесообразность создания комбинированных лекарственных средств на основе растительного сырья с широким спектром лечебного действия, которые будут иметь высокую эффективность, качество и доступность для широких слоев населения.*

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor O.A.Ruban*

UDC 339.13:658.628:178.7 (477)

## ANALYSIS OF THE DRUG ASSORTMENT FOR TREATING NICOTINE DEPENDENCE PRESENTED AT THE PHARMACEUTICAL MARKET OF UKRAINE

M.M.Kobets, Yu.M.Kobets

National University of Pharmacy

*Key words: marketing research; assortment; medicines for treating nicotine dependence; nicotine addiction*

---

*The analysis of the drug assortment for treating nicotine dependence presented at the Ukrainian pharmaceutical market has been carried out according to the ATC-classification and countries-producers with the purpose of providing the population with effective, qualitative and safe medicines. Two types of therapy are used for nicotine addiction: nicotine replacement therapy and therapy with the use of medicines, which do not contain nicotine. In the process of our investigations it has been found that 11 trade names (TD) of medicines for treating nicotine dependence (MTND) have been registered in Ukraine. Among them there are 8 nicotine-containing drugs, 1 medicine contains cytisine, 1 includes varenicline and 1 is a homeopathic medicine produced by 5 countries. It has been determined that the majority of medicines for treating nicotine dependence are presented by foreign producers at the Ukrainian market. The majority of the drug assortment for treating nicotine dependence is imported drugs of such pharmaceutical companies as McNeil, AB (Sweden); Novartis Consumer Health, S.A. (Switzerland); Sopharma (Bulgaria), Pfizer (the USA). The analysis of medicines for treating nicotine dependence has been carried out by medicinal forms. Medicines for treating nicotine dependence are presented at the market of Ukraine in such forms as chewing gums, tablets, transdermal plasters, granules. According to the maximum indexes received the assortment contour of the target segment of the Ukrainian pharmaceutical market of MTND (macrocontour) has been developed. The macrocontour of the target market segment can be used for studying the assortment of a particular chemist's shop with the purpose of possibility of the assortment extension.*

---

Harmful consequences of tobacco use have been already proven. But there are a lot of people, who either do not know about them or do not want to give up this bad habit or can not do it. Sociological investigations testify that the major part of smokers (60-70%) are trying to give up this bad habit. However, according to the narcologists' opinion, nicotine addiction may be as strong as heroin addiction [2, 15].

Smoking consequences represent a great danger to humanity even more than AIDS, tuberculosis, maternal mortality, traffic accidents, suicides and murders taken together [5, 9].

Due to predictions of scientists at the University of Edinburgh (Britain) if nicotine consumption does not change the present rate, this figure will reach 10 million by 2030. Totally nicotine will kill about one billion of people in the XXI-st century [3].

According to the World Health Organization, Ukraine sets the 17-th place among all countries as to nicotine consumption. It is 1.5% of all cigarettes in the world, while the population of Ukraine is not more than 0.85% of the Earth population. There are about 9 million of active smokers in Ukraine. They are the third of all population capable to work. This is a great number of people, their health can be improved without material costs involvement by having influence only on one factor – smoking. Therefore, nicotine control is one of the major problems in our country [8, 14, 15].

One of the ways to help smokers to get rid of nicotine dependence is taking medicines for treating nicotine dependence (MTND). It is reasonable to conduct the marketing research of the MTND market segment. The results of these investigations give the opportunity to determine availability and the level of providing with such medicines, as well as the tendency for market development of the medicines under research.

Among the scientific works closely connected with the research direction, there are significant works of such scientists as Z.M.Mnushko [7], I.V.Pestun [7], V.K.Smirnov [11], O.I.Yermolova [11], O.I.Speranska [11], S.K.Zyryanov [15], Yu.B.Belousov [15] and others.

The aim of this work is to research the domestic market of MTND for further study of availability of these medicines and possibility of demand satisfaction in nicotine dependence treatment.

### **Materials and Methods**

Monitoring over the situation at the market has been conducted on the basis of official sources content analysis as to drugs, which help to give up smoking: the State Register of medicines of Ukraine, Compendium 2013, Rx-Index classifier of drugs.

### **Results and Discussion**

Nicotine is the major smoking pathological factor. It is a colourless and odourless alkaloid, which is part of *Solanaceous* family, mainly tobacco [4]. The name “nicotine” comes from the Latin word “*nicotina tabacum*”

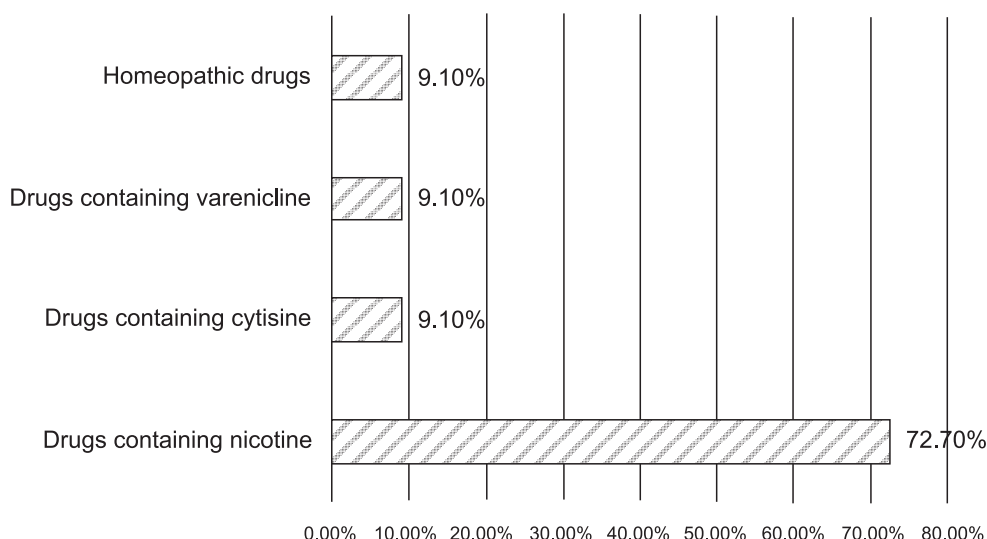


Fig. 1. The Ukrainian market of medicines for treating nicotine dependence by active substances.

received its name from the family name of a French ambassador Jean Nicot, who brought tobacco seeds and leaves to France in the middle of the XVI-th century [6, 13].

At present the Ukrainian drug market is presented by domestic and foreign producers of MTND. But the choice must be determined by the convenience of a medicinal form, economic availability and efficiency for a specific patient. Two types of therapy are used for nicotine addiction: nicotine replacement therapy and therapy with the use of medicines, which do not contain nicotine.

The main conception based on the stage-by-stage analysis of the MTND assortment has been used according to the following criteria: the ATC-classification (anatomic-therapeutic-chemical classification), medicinal forms, country and company-producer [1, 10]. According to the results of analysis the assortment macrocontour of the target market segment has been composed in order to satisfy the demand in medicines for

treating nicotine dependence. The period of analysis was 2013.

In total 11 trade names (TD) of medicines for treating nicotine dependence have been selected during the content analysis [10, 12]. Among them there are 8 nicotine-containing drugs (72.7%), 1 medicine contains cytisine (9.1%), 1 includes varenicline (9.1%) and 1 is a homeopathic medicine (9.1%) produced by 5 countries (Fig. 1).

About 3/4 of medicines at the market are nicotine-containing drugs, which are represented by foreign producers and manufactured in two medicinal forms: 75% nicotine-containing drugs in the form of a chewing gum, 25% – as a transdermal plaster.

During the analysis it has been found that the most MTND at the Ukrainian market are presented by foreign producers (91%).

The majority of the drug assortment for treating nicotine dependence is imported drugs of such pharmaceu-

Table

The firm structure of the Ukrainian market of drugs for treating nicotine dependence

Country	Manufacturer	Trade name of the drug	The number of trade names		Medicinal form
			Abs.	Share, %	
<b>Nicotine replacement therapy</b>					
Sweden	McNeil, AB	Nicorette with a mint flavour	6	54.5	chewing gum
		Nicorette with the taste of fresh mint			chewing gum
		Nicorette, winter mint			chewing gum
		Nicorette with the taste of fresh fruit			chewing gum
		Nicorette, flavoured mint			chewing gum
		Nicorette transdermal patch			transdermal patch
Switzerland	Novartis Consumer Health, S.A.	Nicotinell with a mint flavour	2	18.2	chewing gum
		Nicotinell transdermal patch			transdermal patch
<b>Medicines that contain no nicotine</b>					
Bulgaria	Sopharma	Tabex (cytisine)	1	9.1	tablets
USA	Pfizer (USA)	Champix (varenicline)	1	9.1	tablets
Ukraine	"National Homoeopathic Society" JSC	Tabacum-Plus (varenicline)	1	9.1	granules
			<b>Total: 11</b>		

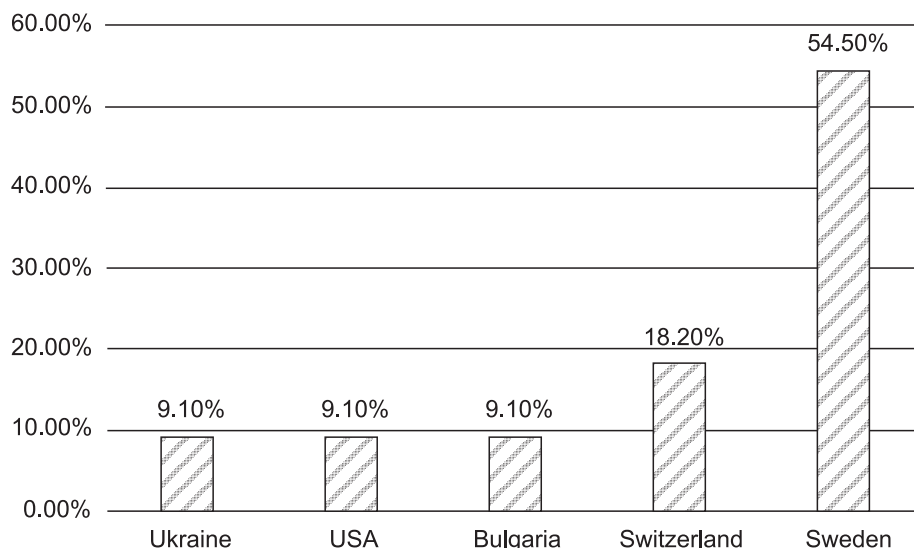


Fig. 2. The structure of the commodity market of drugs treating nicotine dependence registered in Ukraine by countries-producers, %.

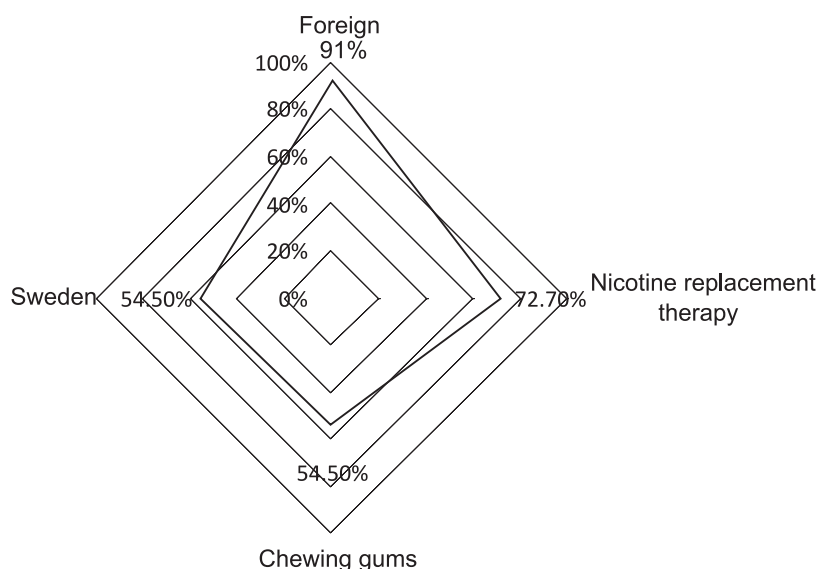


Fig. 3. The assortment macrocontour of the target segment of the pharmaceutical market of MTND.

tical companies as McNeil, AB (Sweden) – 54.5%; Novartis Consumer Health, S.A. (Switzerland) – 18.2%; Sopharma (Bulgaria) and Pfizer (the USA) – 9.1% (Table).

Distribution of medicines registered for treating nicotine dependence among the countries-producers is shown in Fig. 2. Unfortunately, the share of a domestic producer is only 9.1%.

Medicines for treating nicotine dependence are presented at the Ukrainian market in such medicinal forms as tablets, chewing gums, transdermal plasters, granules. Nicotine-containing drugs are produced in the form of chewing gums (54.5%) and transdermal plasters (18.2%) and provide modified nicotine release. Other medicines are produced in the form of tablets (18.2%) and granules (9.1%) (Table).

According to results of the analysis the assortment contour (macrocontour) of the target segment of the Ukrainian pharmaceutical market has been developed taking into account the maximum index-characteristics [1] (Fig. 3).

Information received on the basis of the macrocontour allows to form the chemist's assortment policy depending on the available proposal and demand for these medicines.

Thus, in the process of our research it has been found that foreign MTND are 91%, the majority of foreign medicines are nicotine-containing drugs (72.7%), among them 54.5% of medicines are presented in the form of a chewing gum and are produced by Swedish companies-producers.

The marketing data of the domestic market analysis of medicines for treating nicotine dependence are the basis for further prediction and can be used by chemist's and pharmaceutical companies with the purpose of development of variants for their strategy of development, goods assortment and the influence on the consumers' behaviour.

#### CONCLUSIONS

1. The assortment of MTND registered at the Ukrainian market has been analyzed according to the ATC-classification. Eleven trade names of medicines for treating nicotine dependence have been registered in Ukraine.

2. The assortment of MTND available in Ukraine has been investigated by countries-producers. The majority of MTND at the market of Ukraine is presented by foreign producers (91%).

3. Analysis of MTND has been carried out by medicinal forms. Medicines for treating nicotine dependence are presented at the market of Ukraine in such forms as chewing gums (54.5%), tablets (18.2%), transdermal plasters (18.2%), granules (9.1%).

4. According to the maximum indexes received the assortment contour of the target segment of the Ukrainian pharmaceutical market of MTND (macrocontour) has been developed. The macrocontour of the target market segment can be used for studying the assortment of a particular chemist's shop with the purpose of possibility of the assortment extension.

It is reasonable to carry out further investigations for studying MTND availability.

#### REFERENCES

1. Dremova N.B., Ovod A.I. // *Kursk scientific and practical reporter "Man and its health"*. – 2006. – №3. – P. 41-54.
2. Golichenko M. *Canadian HIV/AIDS Legal Network*. – 2011. – P. 8-13.
3. Holtfreter B. // *J. of Clin. Periodontol.* – 2010. – Vol. 37. – P. 211-219.
4. Kolassa E. // *J. of Pharmac. Marketing and Management*. – 2002. – Vol. 14, №3-4. – P. 101-108.
5. Malhotra S. // *J. of Pharmac. Marketing and Management*. – 2004. – Vol. 16, №4. – P. 97-106.
6. Martsevich S.U., Lukina U.V. // [Electronic resource]: – Режим доступу: <http://elibrary.ru/item.asp?id=18747155>
7. Mnushko Z.N., Pestun I.V. *Theory and practice of marketing investigations in pharmacy*. – Kharkov: publ. NPhaU, 2008. – P. 15-22.
8. Niklaus P. Lang // *J. of Clin. Periodontol.* – 2009. – Vol. 36. – P. 3-8.
9. Philip M. Preshaw // *J. of Clin. Periodontol.* – 2009. – Vol. 36. – P. 1-2.
10. Rx-index. *Classifier of medical preparations*. [Electronic resource]: – Regime of access :<http://www.rxindex.com.ua/atc#N07BA>
11. Smirnov V.K., Ermolova O.I., Speranskaya O.I. // *Narcol.* – 2010. – №6. – P. 36-39.
12. *State register of medicines* [Electronic resource]: – Regime of access: <http://www.drlz.Kiev.ua/>
13. Tonnesen P. // *JAMA*. – 2003. – Vol. 269. – P. 1268-1271.
14. Velitchka D., Weitz B. // *J. of Marketing*. – 2006. – Vol. 70, №1. – P. 48-56.
15. Ziryanyov S.K., Belousov U.B. // *Preventive Medicine*. – 2010. – Vol. 13, №6. – P. 21-23.

#### АНАЛІЗ АСОРТИМЕНТУ ПРЕПАРАТІВ, ЩО СПРИЯЮТЬ ВІДМОВІ ВІД ТЮТЮНОПАЛІННЯ, ПРЕДСТАВЛЕНИХ НА ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ РИНКУ УКРАЇНИ

**М.М.Кобець, Ю.М.Кобець**

**Ключові слова:** маркетингові дослідження; асортимент; препарати, що сприяють відмові від тютюнопаління; нікотинова залежність

З метою забезпечення доступності населення до ефективних, якісних та безпечних лікарських засобів проведено аналіз асортименту представлених на фармацевтичному ринку України препаратів, що сприяють відмові від тютюнопаління, за АТС-класифікацією та країнами-виробниками. При нікотиновій залежності використовують 2 види терапії: нікотинозамісну терапію і терапію з використанням лікарських засобів, що не містять нікотину. У ході досліджень встановлено, що в Україні зареєстровано 11 торгових назв препаратів для лікування нікотинової залежності, серед яких 8 нікотинівмісних препаратів, (1 препарат містить цитизин, 1 – вареніклін та 1 гомеопатичний препарат), що випускаються 5 країнами-виробниками. Встановлено, що більшість препаратів, які сприяють відмові від тютюнопаління, на ринку України представлені іноземними виробниками. Більшість асортименту лікарських препаратів для лікування нікотинової залежності складають імпортовані препарати фармацевтичних компаній McNeil, AB (Швеція), Novartis Consumer Health, S.A. (Швейцарія), Sopharma (Болгарія), Pfizer (США). Проведено аналіз препаратів, що сприяють відмові від тютюнопаління, за лікарськими формами. Лікарські засоби для лікування нікотинової залежності представлені на ринку України у вигляді таких лікарських форм, як гумки жувальні, таблетки, пластри трансдермальні та гранули. За отриманими максимальними показниками розроблений асортиментний контур цільового сегменту фармацевтичного ринку препаратів, що сприяють відмові від тютюнопаління (макроконтур). Макроконтур цільового сегменту ринку може бути використаний для вивчення асортименту окремої аптеки (мікроконтур) з метою можливості поповнення асортиментних портфелів.

**АНАЛИЗ АССОРТИМЕНТА ПРЕПАРАТОВ, СПОСОБСТВУЮЩИХ ОТКАЗУ ОТ ТАБАКОКУРЕНИЯ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ РЫНКЕ УКРАИНЫ****М.Н.Кобец, Ю.Н.Кобец**

*Ключевые слова:* маркетинговые исследования; ассортимент; препараты, способствующие отказу от табакокурения; никотиновая зависимость

С целью обеспечения доступности населения к эффективным, качественным и безопасным лекарственным средствам проведен анализ ассортимента препаратов, способствующих отказу от табакокурения, представленных на фармацевтическом рынке Украины, по АТС-классификации и странам-производителям. При никотиновой зависимости используют 2 вида терапии: никотинозаместительную терапию и терапию с использованием лекарственных средств, не содержащих никотина. В ходе исследования установлено, что в Украине зарегистрировано 11 торговых названий препаратов для лечения никотиновой зависимости, среди которых 8 никотинсодержащих препаратов (1 препарат содержит цитизин, 1 – варениклин и 1 гомеопатический препарат), которые выпускаются 5 странами-производителями. Установлено, что большинство препаратов, которые способствуют отказу от табакокурения, на рынке Украины представлены иностранными производителями. Большинство ассортимента лекарственных препаратов для лечения никотиновой зависимости составляют импортные препараты фармацевтических компаний Mcneil, AB (Швеция), Novartis Consumer Health, S.A. (Швейцария), Sopharma (Болгария), Pfizer (США). Проведен анализ препаратов, которые способствуют отказу от табакокурения, по лекарственным формам. Лекарственные средства для лечения никотиновой зависимости представлены на рынке Украины в виде таких лекарственных форм, как резинки жевательные, таблетки, пластыри трансдермальные и гранулы. По полученным максимальным показателям разработан ассортиментный контур целевого сегмента фармацевтического рынка препаратов, способствующих отказу от табакокурения (макроконтур). Макроконтур целевого сегмента рынка может быть использован для изучения ассортимента отдельной аптеки (микроконтур) с целью возможности пополнения ассортиментных портфелей.



*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor A.S.Nemchenko*

UDC 615.15:349.3

## RESEARCH OF PRIMARY DIRECTIONS OF THE PHARMACY SPECIALISTS SOCIAL PROTECTION IN UKRAINE ON THE BASIS OF SOCIAL PROTECTION IN THE EUROPEAN UNION

M.V.Zarichkova

National University of Pharmacy

*Key words: social protection; pharmacy professionals; social protection of pharmacy specialists; pharmaceutical industry; labour protection; social officer; social service of pharmacy professionals*

*Current economic models of social protection in the EU and mechanisms of their coordination have been analysed in the article. Priorities of the social protection system development in the EU member states, including social measures, which promote innovative economic development on the basis of human capital improvement, have been also considered in the article. It has been determined that a certain type of social protection and its provision depend upon the size and number of contributions to the relevant social protection institutions; the right to social protection is related to the fact of residence in one of the EU member states where each country applies its own legislation on this issue. We consider that creation of an effective social protection system in Ukraine depends on many factors and the use of good practices of the EU countries and important international organizations is one of the factors. To create a modern and efficient system of social protection for pharmacy specialists in Ukraine, it is offered to involve the international experience, in particular the experience of the EU member states. We consider that it is necessary to define a constructive way to achieve high standards of the social life in our country and to develop various social programmes for the domestic pharmaceutical industry, to introduce them into the government activity, having implemented them into the state and regional legal framework.*

Nowadays the system of social protection (SP) of the population is important for the member states of the European Union (EU) with a socially oriented market economy. European integration processes in Ukraine require the introduction of new regulatory measures for implementation of the population social protection system. Social development of the community is essential in meeting the needs and aspirations of people and in performing the obligations of governments and all sectors of the civil society, in particular of the pharmaceutical industry and its employees – pharmacy specialists (PhS). Therefore, determination of the priorities of improving of social protection for pharmacy specialists (SPPHS) in Ukraine is urgent [3].

Analysis of the literature has shown that the need for SP as a particular system of legal rules appeared in the middle of the 1950s. However, there is no clearly defined legislative regulation of SPPHS in Ukraine till nowadays and there are a lot of problems in this area. General issues of SP were investigated by L.Zabelin, M.Semashko, V.Durdenevsky, B.I.Stashkiva, M.L.Zakharov, Ye.H.Tuchkova, O.V.Posylkina, A.A.Kotvitska, A.S. Nemchenko, etc., but problems of SPPHS actually were not studied. We emphasize SPPHS in our studies and suggest priorities for SPPHS improvement. The above stated has become the basis for our research.

### Materials and Methods

In our research the methods of logical, historical, analytical analysis; methods of sociological surveys (questionnaires and interviews) were used.

### Results and Discussion

Based on the literature analysis the foreign experience, in particular the experience of the EU member states, seems to be reasonable for creating a modern and efficient system of SPPHS in Ukraine.

Basic principles, legal principles and forms of social protection (SP) in the EU member states are subject to the following legislative acts: the European Social Charter, the Community Charter of the Fundamental Social Rights of Workers, the Treaty establishing the European Community, Regulation 1408/71 (a complex act that defines the concept of a person in the field of SP), etc. [1, 3, 5].

A lot of influential international organizations such as International Association of Social Protection, International Labour Organization, UN, EU, EBRD, IMF applying a lot of effort to improve the social and economic situation in the world have been founded to resolve the SP-related issues.

Today, the international community prefers the SP system of the EU countries, which have achieved tangible results in the wealth growth of their citizens, labour force modernization and stability enhancing of the internal political situation, social compliance, etc., on the basis of socially-oriented economies.

The analysis of the literature shows that there are four economic models of SP in the EU countries:

1) Continental (Bismarck) model developed according to the principle of the professional solidarity. It is used in Germany and France. The model is based on the

insurance funds, which accumulate social earnings contribution and connect strongly the SP level with the professional activity duration. The principle of the professional solidarity that is typical for this model provides employees and employers with the fund management on the parity basis, allowing them to exist without the state budget support.

The powerful national social programmes allow the poor, who do not receive insurance benefits (due to the lack of the qualifying period) for various reasons, to receive a budget transfer.

2) Anglo-Saxon (Beveridge) model is based on the principle of the national solidarity. It sets common conditions of social security payments and their size for all subjects. This model is focused on the dominance of social aid of the state budget origin over the low social benefits of employees' and employers' insurance premiums in Great Britain and Ireland.

3) Scandinavian model applies social services and requirements for everybody without exception; it is not associated with either the insurance premium rates or the professional activity duration. This model is used in Denmark, Sweden and Finland. The active disposition of taxation funds by the governmental bodies equalizes the incomes and guarantees their receipt.

4) South European model is still at the stage of development. It has the following characteristics: the low level of social protection, shifting the main burden of social support onto family members, the passive state policy, focusing on the costs compensation only for particular categories of citizens. A significant asymmetry in the structure of social expenditures is also typical for this model. This model is used in Spain, Italy, Greece and Portugal. So, the Italian government allocates the largest share of social expenditures into the pension system (14.7% of GDP while the average European level is 12.5%), and about 1% – into the family support, education, employment policy [1-3, 5-10].

The establishment and operation of the structural funds should be mentioned among the most effective mechanisms of SP of the EU. These funds are coordinated by the European Council. The European Regional Development Fund, the European Agricultural Guarantee Fund, the Cohesion Fund are the most functional institutions nowadays. 195 Billion Euros were allocated from the EU budget for their operation from 2008 to 2013. Today the expenditures for them are 36.8% of the EU expenditures. Activity of the Funds is enhanced by implementation of the EU initiative programmes with 10 billion Euro budget.

The emphasis is put upon two of the 13 existing programmes – “Employment” and “Adept”. The purpose of “Employment” programme is to improve the employment situation and vocational training systems, to implement innovative methods in these areas. The purpose of “Adept” programme is to facilitate the employees' adaptation to changes and challenges of the economy, to assist in competitiveness maintaining within new economic conditions. These programmes are being constantly corrected taking into account the require-

ments of the time. For example, the following sub-programmes: SME (Support for the Small and Medium Sized Enterprises), Strade (strengthening of the technological base of small and medium sized enterprises), Telematic (providing with communication and telecommunications services) have been recently added to the “Adept” programme. The types of assistance may include measures of the infrastructure development, industrial investment in job creation, education development, etc. [1, 2, 3, 6].

Priorities of SP systems development in the EU countries are social activities, which promote innovative economic development on the basis of the human capital improvement. A certain type of SP and its provision depend on the size and number of contributions made to the relevant institutions of SP. Right to SP is associated with the fact of living in one of the EU member states, but each country uses its own SP legislation [7, 8].

As for Ukraine, the process of an effective SP system creation depends on many factors, one of which is the use of the foreign experience. The use of good practices of the EU countries and important international organizations helps to identify the constructive way to achieve high standards of social life in our country and develop various social programmes for the domestic pharmaceutical industry and introduce them into the government activity, having implemented them into the state and regional legal framework. Ukraine has adopted the way of France and Germany using the principle of professional solidarity with an emphasis on the insurance funds, accumulation of social earnings contribution and the SP level dependence on the professional activity duration. Certainly, it is impossible to copy the SP system of the developed countries in the legal field of Ukraine, but it is worth to use their good practice while constructing the own SPPHS system [4, 9].

The main measures in Ukrainian sectorial legislation reformation are required to improve the SPPHS situation. Thus, the legislation, which regulates social issues, is divided between various ministries, agencies and funds. At present the relationships in the health sector are regulated by more than 5.5 thousand legislative acts. Their great number requires reformation and systematization in order to simplify their use and enhance efficiency by all means considering industry specificity. It is necessary to adopt special laws, which can help to solve specific problems, including the provision PhS' rights and guarantees with the real meaning, for example, the Law “On the Social Protection of Pharmacy Specialists”. These improvements will allow to reach the European and world labour standards and social living standards of PhS.

The human right to the healthcare is one of the basic ones; however, it is possible to take care of a patient, to protect PhS's right to health only when PhS feels own protection. Insufficient protection of PhS's rights is caused by such causes as the absence of clear legal mechanisms for exercising these rights; PhS' ignorance and the lack of experience in asserting their rights.

The introduction of professional self-government in the healthcare system and of the mediation practice

Table

## Characteristics of the priorities affecting the improvement of SPPhS in Ukraine

Priorities of SPPhS improvement	Solutions
Reforming of the existing SPPhS system. Political, philosophical and economic plan	<ul style="list-style-type: none"> <li>– To analyse carefully the most successful experience of the SP reform in all countries, especially the experience of solving financial problems;</li> <li>– to conduct convergence SP models of European countries, introduce common principles of SP organization in Ukraine, combine basic underlying principles that are relevant to the historical process occurred in Ukraine;</li> <li>– SPPhS should become a social contract in political and philosophical sense and meet the demands of social justice, it will provide sustainability of social and economic conditions of the SP existence;</li> <li>– economically SPPhS should meet the following principles: universality (SP covers all risks and applies to all categories of PhS), the presence of the uniform treatment, equal social contributions;</li> <li>– to introduce the term “social protection of pharmacy specialists” at the level of the pharmaceutical industry taking into account industry specificity and occupational specification;</li> <li>– to strengthen institutionally the pharmaceutical industry of Ukraine and restore the social importance of the pharmaceutical industry.</li> </ul>
Social policy of the pharmaceutical industry. Labour safety improvement. Catalogue of PhS' main complaints	<ul style="list-style-type: none"> <li>– To develop and implement a range of measures on SPPhS improvement to the activity of pharmaceutical institutions taking into account the actual labour conditions;</li> <li>– to introduce the term <i>professional burnout of pharmacy specialists</i> to the List of Occupational Diseases;</li> <li>– to add the clause “Social and psychological assistance in the professional burnout of pharmacy specialists (counselling, supporting, diagnosis, correction, psychological therapy, rehabilitation) to the List of social services provided to individuals, who have difficult life circumstances and are not able to overcome them;</li> <li>– to develop the mechanism of identifying PhS' needs for social services and the mechanism of their providing in the pharmaceutical industry.</li> </ul>
Settling of conflicts between PhS, the employer and the executive branch	<ul style="list-style-type: none"> <li>– To assign an authorized person, who is responsible for social issues, at the LC of pharmaceutical institutions of all types of ownership;</li> <li>– to determine the qualification requirements for the staff support and develop the position description of APSI;</li> <li>– to enhance the importance of civil and self-regulating organisations in the SPPhS system.</li> </ul>

should become important measures to help to protect the PhS' rights like in every developed country. Mediation as a method of protection of the rights and interests of subjects of legal relations in the health sector has certain advantages – speed, absence of financial expenditures and conflict resolution without suing.

Historically, just SP of the population has developed in Ukraine, but industry specificity and SPPhS have been left without proper attention. Such disregard of SPPhS has a negative impact on the social situation of the pharmaceutical industry, in particular little attention is paid to a PhS as to a personality. Therefore, it is necessary to introduce the terminological definition of SPPhS [6].

SPPhS is the function of the state on implementation of the social policy priorities in the pharmaceutical industry, namely implementation of a set of economic, legal and social guarantees formalized in legislation, providing PhS with the most important social rights in the professional activity, including adequate living standard, which is necessary for normal recovery and personal development.

SPPhS can be represented as physical protection; support protection; preventive protection; compensative protection and be implemented in the form of social insurance, social assistance and social service to

pharmacy specialists (SSPhS). Basic principles of the SSPhS should be as follows: targeting; transparency; voluntariness; humanity; the priority of social services to the population groups, who need such assistance most of all; preventive orientation [4, 9].

SSPhS must have legislative and normative legal regulation and be based on state standards, which establish the main requirements for the amount and quality of social service, procedure and conditions of its providing. Complex social service centres, territorial social assistance centres, pharmaceutical enterprises can render SSPhS, regardless of the forms of ownership.

Wide-ranging reforming measures in the healthcare sector and formation of the clear system of coordination between the employer, organizations and executive agencies that would promote the creation of a modern system of SSPhS are required for effective reform in the pharmaceutical industry and for creation of the functional system of SP in the country. To improve the interaction between the parties of social partnership: “PhS – employer”, eliminate the social tension in the pharmaceutical institution and resolve possible conflicts, *an authorized person responsible for social issues (APSI)* is required to be assigned at the labour collective (LC) of pharmaceutical institutions of all forms of ownership.

Depending on the staff of the pharmaceutical institution and the number of LC, it is possible to introduce a separate position of an APSI or entrust a representative of LC elected at the labour meeting with the corresponding responsibilities. Then the relationships will be as follows: "labour collective – employer – authorized person responsible for social issues – civil organizations – executive branch" [7, 9, 10].

PhS' labour is one of the most difficult and the most responsible occupations among modern ones in Ukraine. PhS during his/her professional activity is influenced by a wide range of factors of the physical, chemical and mental nature, which may lead to functional strain of individual organs and body systems, as well as to nervous emotional tension in general, and it causes development of "professional burnout". In 2001 the WHO identified the "burnout syndrome" as a physical, emotional or motivational exhaustion, which is characterized by impaired performance at work and other negative consequences. Prolonged working day of PhS can also cause it. Although PhS have rights to shortened working hours and the additional paid leave according to the legislation, employers ignore these rights, especially it often happens at private pharmacies (sometimes a working day can exceed 12 hours). That is why occu-

pational diseases, especially the "professional burnout" of PhSs, occur more often [9].

Today the process of reconsidering new approaches to providing SPPHS is taking place not only at the national level, but also at the industrial level. The provisions of such legal documents as "National Security Concept", "Information Security Doctrine", etc., confirm this fact.

The current system of SPPHS indicates the need to revise the legal documents on these issues and their harmonization with the actual labour conditions in the pharmaceutical industry for a range of priority areas (Table).

#### CONCLUSIONS

The studies conducted indicate the fact that the priority areas for SPPHS improvement can be developed in the following ways: by reforming the existing SPPHS system on the basis of the political, philosophical and economic plan; by developing the mechanism of identifying PhS' needs for social services and the mechanism of their providing in the pharmaceutical industry, which is oriented to the labour safety improvement and development of the catalogue of the PhS' main complaints; by settling conflicts between PhS, the employer and the executive branch.

#### REFERENCES

1. Жиглей І.В. // Вісник ЖДТУ. – 2008. – №4(46). – С. 71-79.
2. Мартин Э. // Свободная мысль – XXI. – 2005. – №8. – С. 102.
3. Система соціального захисту в країнах учасницях ЄС. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://textbooks.net.ua/content/view/4444/37/>.
4. Толочко В.М., Зарічкова М.В. // Інформ. лист. – Х.: Вид-во НФаУ, 2013. – 3 с.
5. European Network for Health Technology Assessment [web site]. Copenhagen, National Board of health. – 2007 (accessed 7) April 2008. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.eunetha.net>.
6. Pieters D. // Eur. J. of Social Security. – Schoten, 2003. – Vol. 5, №4. – P. 287-304.
7. Polton D., Paris V., Sandier S. // Health Care Systems in Transition: France. – Copenhagen, WHO Regional Office for Europe on Behalf of the European Observatory on Health Systems and Policies. – 2004. – P. 5.
8. Robert H. Lauer, Jeanette C. Lauer. Social Problems and the Quality of Life [Text]. – Boston (Mass.) etc.: Mc.Graw. – Hill, 2004. – 431 p.
9. Tolochko V., Zarichkova M., Medvedyeva Y., Tolochko K. // Intern. J. of Pharmac. Sci. Review and Res. – Vol. 18, Issue 1, January – February 2013. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.globalresearchonline.net/pharmajournal/vol18iss1.aspx>.
10. Tolochko V., Medvedyeva Y., Zarichkova M., Tolochko K. // Intern. J. of Pharmac. Sci. Review and Res. – Vol. 13, Issue 2, March – April 2012. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [www.globalresearchonline.net/pharmajournal/vol13iss2.aspx](http://www.globalresearchonline.net/pharmajournal/vol13iss2.aspx).

#### ДОСЛІДЖЕННЯ ПРІОРИТЕТНИХ НАПРЯМКІВ УДОСКОНАЛЕННЯ СОЦІАЛЬНОГО ЗАХИСТУ СПЕЦІАЛІСТІВ ФАРМАЦІЇ УКРАЇНИ НА ОСНОВІ СИСТЕМ СОЦІАЛЬНОГО ЗАХИСТУ В ЄС

**М.В.Зарічкова**

**Ключові слова:** соціальний захист; спеціалісти фармації; соціальний захист спеціалістів фармації; фармацевтична галузь; охорона праці; уповноважена особа з соціальних питань; соціальне обслуговування спеціалістів фармації

Проаналізовані існуючі економічні моделі соціального захисту в країнах ЄС та механізми їх координації. Також розглянуті пріоритети розвитку систем соціального захисту в країнах членах ЄС, до яких відносяться соціальні заходи, які сприяють інноваційному розвитку економіки на підставі вдосконалення людського капіталу. Встановлено, що певний вид соціального захисту і його надання залежать від розміру та кількості внесків, зроблених до відповідних інститутів соціального захисту, а право на соціальний захист пов'язується із фактом про-

живання в одній із країн членів ЄС, де кожна країна користується власним законодавством з цього питання. Вважаємо, що процес створення ефективною системи соціального захисту в Україні залежить від багатьох чинників, одним із яких є використання позитивного досвіду країн ЄС та впливових міжнародних організацій. Для створення сучасної та дієвої системи соціального захисту спеціалістів фармації України пропонується залучення закордонного досвіду, зокрема, країн-учасниць ЄС. Вважаємо за необхідне визначити конструктивний шлях досягнення високих соціальних стандартів життя в нашій країні, а також розробити для вітчизняної фармацевтичної галузі різноманітні соціальні програми, впровадити їх у практику діяльності уряду з попередньою імплементацією у державну та регіональну нормативно-правову базу.

---

## **ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИОРИТЕТНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ УЛУЧШЕНИЯ СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ СПЕЦИАЛИСТОВ ФАРМАЦИИ УКРАИНЫ НА ОСНОВЕ СИСТЕМ СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ В ЕС**

**М.В.Заричковская**

**Ключевые слова:** социальная защита; специалисты фармации; социальная защита специалистов фармации; фармацевтическая отрасль; охрана труда; уполномоченное лицо по социальным вопросам; социальное обслуживание специалистов фармации

Проанализированы существующие экономические модели социальной защиты в странах ЕС и механизмы их координации. Также рассмотрены приоритеты развития систем социальной защиты в странах-членах ЕС, к которым относятся социальные мероприятия, способствующие инновационному развитию экономики на основании совершенствования человеческого капитала. Установлено, что определенный вид социальной защиты и его предоставление зависят от размера и количества взносов, сделанных в соответствующие институты социальной защиты, а право на социальную защиту связано с фактом проживания в одной из стран ЕС, где каждая страна пользуется собственным законодательством по этому вопросу. Считаем, что процесс создания эффективной системы социальной защиты в Украине зависит от многих факторов, одним из которых является использование положительного опыта стран ЕС и влиятельных международных организаций. Для создания современной и эффективной системы социальной защиты специалистов фармации Украины предлагается привлечение зарубежного опыта, в частности, стран-участниц ЕС. Считаем необходимым определить конструктивный путь достижения высоких социальных стандартов жизни в нашей стране, а также разработать для отечественной фармацевтической отрасли различные социальные программы, внедрить их в практику деятельности правительства с предыдущей имплементацией в государственную и региональную нормативно-правовую базу.

---

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФАРМАКОЛОГІЯ

---

*Recommended by Doctor of Pharmacy, professor N.M.Kononenko*

UDC 616.992.282:615.371:615.015.33

### THE STUDY OF THE THERAPEUTIC ACTION OF THE CELL-ASSOCIATED ANTIGENS OF *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA TROPICALIS* FUNGI

M.V.Rybalkin

National University of Pharmacy

*Key words: candidiasis; antigen; vaccine; therapy*

---

*Fungi of Candida genus are the most widespread causative agent of fungal infections. Candida causes a wide range of infections: from insignificant diseases of the skin and mucous membranes to invasion processes that can practically destroys all organs. Development of a vaccine against candidiasis is the topical issue of modern pharmacy and medicine. Suspensions of cells of Candida albicans and Candida tropicalis fungi were subjected to the action of ultrasound, then filtered through a "Vladipore" membrane MFA-MA No.3 providing separation of the biological material with the size of 10 kDa and its concentration. Then prefiltration and sterilizing filtration were carried out. The resulting purified antigens of Candida albicans fungi cells with the protein concentration of 3 mg/ml and Candida tropicalis with the protein concentration of 5 mg/ml were mixed in the ratio of 1:1 using a mixer with the rotation speed of 100 rpm for 10 min. In the experiment two-month white mice with the body weight of 18-22 g were used; there were 6 animals in the control and test groups. The animals were infected intraperitoneally with the suspension of Candida albicans in the amount of 20 mln of cells and Candida tropicalis in the amount of 60 mln of cells in the volume of 1 ml. In 5 days the cell-associated antigens of Candida fungi in the volume of 0.2 ml were injected intramuscularly to mice in the upper part of the rear right paw. In 14 days the procedure was repeated. The animals of the control group were injected with the sterile 0.9% isotonic saline solution. After that in 14 days the animals were examined and the results were determined. According to the research results it has been found that the cell-associated antigens of Candida albicans and Candida tropicalis provide the therapeutic effect in 100% of animals when injected intramuscularly in the volume of 0.2 ml.*

---

Fungi of *Candida* genus are the most widespread causative agent of fungal infections. *Candida* causes a wide range of infections: from insignificant diseases of the skin and mucous membranes to invasion processes that can practically destroys all organs [1, 3, 7]. Such wide range of infections requires also a wide range of diagnostic and therapeutic strategies.

According to many researchers the use of vaccines for treating candidiasis is considered to be a promising direction. Such studies are carried out actively both on the territory of the former Soviet Union, and in Europe and America [2, 4, 6, 8]. It should be noted that currently no domestic vaccine is produced in Ukraine and no imported vaccines have been registered. Therefore, development of a vaccine against candidiasis is the topical issue of modern pharmacy and medicine.

Different researchers propose several variants of vaccines, but they have no consensus. Subunit vaccines are one of the varieties of vaccines. They consist of the antigen fragments that are capable to provide the adequate immune response. These vaccines can be presented both as particles of microbes and as those obtained in the labo-

ratory conditions by using genetic engineering technologies [5, 9, 10]. The examples of subunit vaccines with the fragments of microorganisms used are vaccines against *Streptococcus pneumoniae* and meningococcus type A.

Multivalent or associated vaccines are used for simultaneous immunization against a number of infections. They can include both homogeneous antigens (for example, anatoxin), and antigens of different nature (particle and molecular, living and dead antigens). The example of the associated vaccine of the first type can be sexta-anatoxin against tetanus, gas gangrene and botulism, of the second type – DTP vaccine, which includes tetanus and diphtheria toxoids, pertussis particle vaccine. The living multivalent associated polio vaccine contains living vaccines of polio virus types I, II, III strain.

The associated vaccine contains antigens in doses that do not cause mutual competition in order to form the immunity to all antigens including in the composition of the vaccine.

As it has been shown in the previous studies, the cell-associated antigens of *Candida albicans* fungi with the protein concentration of 3 mg/ml and *Candida tropi-*

*calis* with the protein concentration of 5 mg/ml in the ratio of 1:1 when injected intramuscularly in the volume of 0.2 ml to healthy mice can stimulate the immunity formation against candidiasis, i.e. after immunization the animals do not develop candidiasis when infected by *Candida* fungi. At present it is necessary to check whether the extracts of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi possess the therapeutic effect in the given dose, namely if when administered intramuscularly to mice with candidiasis the suspension is able to stimulate formation of the immunity against candidiasis and provide the further recovery of the infected mice.

The aim of the work is to study the therapeutic effect of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi.

### Materials and Methods

All studies were conducted in the laminar box maintaining aseptic conditions. To perform the inactivation of the fungal cells of *Candida albicans* of CCM 335-867 strain and *Candida tropicalis* of ATTC 20336 strain, they were preliminary cultivated according to the scheme in the test-tubes on the Sabouraud agar separately at  $25\pm 2^\circ\text{C}$  within 48 hours and the fungal cells were washed with 10 ml of the sterile 0.9% isotonic saline solution. The suspensions of the fungal cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* obtained separately were transferred to the flasks with the Sabouraud agar and incubated at  $25\pm 2^\circ\text{C}$  within 6 days and washed the fungal cells with 25 ml of the sterile 0.9% isotonic saline solution. The microbiological purity of the suspension of the fungal cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* was determined visually and by the method of microscopy. Then centrifugation with the rotation speed of 3000 rpm was conducted for 10 min. The precipitate of the fungi cells obtained was diluted with the sterile 0.9% isotonic saline solution to  $(8.5-9)\times 10^8$  in 1 ml, and the suspensions were standardized by fungal count in Goryaev chamber.

The suspensions of cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi in the volume of 10 ml were subjected to the action of ultrasound for destruction of the fungal cells on an UZUU-21 device at the frequency of 22 kHz, the intensity of 5 W/cm<sup>2</sup> and at the temperature of  $25\pm 2^\circ\text{C}$  for 15 min. All the time the temperature of  $25\pm 2^\circ\text{C}$  was controlled with the help of ultrasonication of the suspensions of cells and maintained by adding a cold water into the surrounding container. Then there was filtration through a "Vladipore" membrane MFA-MA No.3 providing separation of the biological material with the size of 10 kDa and its concentration. The filtrate obtained was presented by the mixture of polypeptides and polysaccharides. In each case the protein content was determined according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU). Then prefiltration using filters with the pore diameter of 0.45  $\mu\text{m}$  and sterilizing filtration using filters with the pore diameter of 0.22  $\mu\text{m}$  were carried out.

We take into account the fact that proteins and polysaccharides possessing the antigenic properties are in

the composition of the cell extract of *Candida* fungi. According to the requirements of the SPhU determination of the active substance in such case is conducted by the substance, which possesses the most expressed antigenic properties, i.e. by protein.

The therapeutic effect of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi was investigated in healthy two-month white mice with the body weight of 18-22 g. There were 6 animals in the control and test groups; they were kept in the same conditions on a standard diet. Before the research the animals acclimatized themselves under experimental room conditions. The animals were infected intraperitoneally with the suspension of *Candida albicans* fungi of CCM 335-867 strain in the amount of 20 mln. of cells and *Candida tropicalis* of ATTC 20336 strain in the amount of 60 mln. of cells in the volume of 1 ml. In 5 days the cell-associated antigens of *Candida albicans* fungi with the protein concentration of 3 mg/ml and *Candida tropicalis* with the protein concentration of 5 mg/ml in the ratio of 1:1 with the volume of 0.2 ml were injected intramuscularly to mice in the upper part of the rear right paw. The animals of the control group were injected with the sterile 0.9 % isotonic saline solution. After that in 14 days the animals were examined and the results were determined.

The test results were considered according to the number of various manifestations of the disease and were estimated by the following scheme: (–) – the absence of manifestations of the disease; a mild form of the disease (+) – unkempt appearance, refusal to eat, the body weight loss, dysfunctions of the excretory organs; a moderate form of the disease (++) – adynamia, unkempt appearance, refusal to eat, the body weight loss, contractures of the neck muscles, the lateral location of the body, dysfunctions of the excretory organs, during the autopsy when examining the mucous membranes of natural orifices the signs of pathological processes, plating of fungi with faeces were revealed; an advanced form of the disease (+++) – adynamia, unkempt appearance, refusal to eat, the body weight loss, contractures of the neck muscles, paralysis of the limbs, convulsions, the lateral location of the body, dysfunctions of the excretory organs, when examining the mucous membranes of natural orifices, internal organs of the animals the signs of such pathological processes as microabscesses in the renal cortical layer, lungs, spleen, liver, etc., isolation of retrocultures of fungi from the animals' organs were revealed.

### Results and Discussion

After infection of the animals according to the scheme described above they were observed within 5 days. Such signs of disease as unkempt appearance, refusal to eat, the body weight loss, dysfunctions of the excretory organs began to exhibit in the infected animals in a day. The manifestations of infection found corresponded to the mild form of the disease (+). On the 4-5-th day the signs of the disease were intensified in some animals; they were adynamia, unkempt appearance, refusal to eat, the body weight loss, contractures of the neck muscles,

Table

The study of the therapeutic effect of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi

Cell-associated antigens of <i>Candida albicans</i> and <i>Candida tropicalis</i> fungi		Control	
After infection	After the second injection	After infection	After the second injection
++	-	+	++
+	-	++	+++
++	-	+	++
+	-	++	+++
++	-	+	+++
++	-	++	+++

Note: - absence of the disease, + - a mild form of the disease, ++ a moderate form of the disease, +++ an advanced form of the disease.

the lateral location of the body, dysfunctions of the excretory organs, when examining the mucous membranes of natural orifices the signs of pathological processes, plating of fungi with faeces were revealed. The manifestations of infection found corresponded to the moderate form of the disease (++).

After double injection of the associated antigens *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi or the sterile 0.9 % isotonic saline solution the animals were carefully observed. In the control group, which was immunized with the sterile 0.9% isotonic saline solution, manifestations of disease intensified in 5-14 days. Adynamia, unkempt appearance, refusal to eat, the body weight loss, contractures of the neck muscles, paralysis of the limbs, convulsions, the lateral location of the body, dysfunctions of the excretory organs were registered. During the autopsy after the experiment when examining the mucous membranes of natural orifices, internal organs of the animals the signs of such pathological processes as microabscesses in the renal cortical layer, lungs,

spleen, liver, etc., as well as isolation of retrocultures of fungi from the animals' organs were revealed.

The therapeutic effect of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi started to appear in 5-14 days after the first injection. In the animals adynamias, contractures of the neck muscles, the lateral location of the body, plating fungi with faeces were weakened or disappeared. In 5-14 days after the repeated introduction of the cell-associated antigens of *Candida* fungi the further improvement and recovery of the animals were observed. The appearance of the animals improved, the appetite appeared, the body weight increased, dysfunctions of the excretory organs disappeared.

The therapeutic effect of the cell-associated antigens of *Candida albicans* fungi with the protein concentration of 3 mg/ml and *Candida tropicalis* with the protein concentration of 5 mg/ml in the ratio of 1:1 was 100 %. The research results are given in Table.

Thus, the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi have the immunogenic and therapeutic activity, as well as the antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi cells separately. However, in case of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi we inject at once only one vaccine against two species of fungi - *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Therefore, the cell-associated antigens of fungi are more promising than the individual antigens of fungi cells.

In the future, it is planned to select experimentally excipients that can provide the long-term storage of the activity of the vaccine developed.

#### CONCLUSIONS

According to the research results it has been found that the cell-associated antigens of *Candida albicans* with the protein concentration of 3 mg/ml and *Candida tropicalis* with the protein concentration of 5 mg/ml in the ratio of 1:1 provide the therapeutic effect in 100% of animals when injected intramuscularly in the volume of 0.2 ml.

Therefore, the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi obtained possess the therapeutic activity and are a subunit combined vaccine of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi.

#### REFERENCES

1. Миленина О.Е., Кравцов Э.Г., Кузьменко Л.Г. и др. // Проблемы мед. микол. – 2006. – Т. 8, №3. – С. 14-16.
2. Пат. 2352355 РФ, МПК7 А 61 К 39/00, А 61 Р 31/00. – 2007139596/13. – Заявл.: 25.10.2007. Опыл.: 25.10.2007.
3. Резниченко Н.А. // Здоровье женщины. – 2006. – №3 (27). – С. 53-55.
4. Aditi Grover, Bhandari B.S., Rai Nishant, Pramesh C. Lakhera // Biotechnol. International. – 2010. – Vol. 3, №1. – P. 4-17.
5. Carvalho A. // Front. Microbiol. – 2012. – Vol. 3. – P. 1-9.
6. Cassone A. // Nature Reviews Microbiol. – 2013. – Vol. 11. – P. 884-891.
7. Diekema D., Arbefeville S., Boyken L. et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 73. – P. 45-48.
8. Han Y., Rhew K.Y. // Arch. Pharm. Res. – 2012. – Vol. 35. – P. 2021-2027.
9. Nabel G.J. // N. Eng. J. Med. – 2013. – Vol. 6, №368. – P. 551-60.
10. Skibinski A.G., David and Barbara C. Baudner, Singh Manmohan, O'Hagan T. Derek // Glob. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 63-72.



## ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ ДІЇ АСОЦІЙОВАНИХ АНТИГЕНІВ КЛІТИН ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS ТА CANDIDA TROPICALIS

**М.В.Рибалкін**

**Ключові слова:** кандидамікоз; антиген; вакцина; терапія

*Candida* викликає широкий діапазон інфекцій: від незначних захворювань шкіри та слизових оболонок до інвазійних процесів, які можуть вражати практично усі органи. Розробка вакцини проти кандидамікозу є актуальним питанням сучасної фармації та медицини. Суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* піддавали дії ультразвуку, фільтрували через мембрану «Владипор» МФА-МА №3 з розміром 10 кДа, проводили попередню та стерелізуючу фільтрацію. Одержані стерильні очищені антигени клітин грибів *Candida albicans* з концентрацією білка 3 мг/мл та *Candida tropicalis* з концентрацією білка 5 мг/мл змішували у співвідношенні 1:1 за допомогою мішалки. У досліді використовували двомісячних білих мишей масою 18-22 г по 6 тварин у контрольних та дослідних групах. Тварин заражали внутрішньоочередово суспензією грибів *Candida albicans* 20 млн клітин та *Candida tropicalis* 60 млн клітин в об'ємі 1 мл. Через 5 діб мишам внутрішньом'язово вводили асоційовані антигени клітин грибів *Candida* у об'ємі по 0,2 мл. Через 14 діб повторювали цю процедуру. Тваринам у контрольній групі вводили стерильний ізотонічний розчин 0,9% натрію хлориду, після чого через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати. За результатами досліджень встановлено, що одержані асоційовані антигени клітин грибів *Candida* забезпечують терапевтичний ефект у 100% тварин при внутрішньом'язовому введенні в об'ємі 0,2 мл.

## ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АССОЦИИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ КЛЕТОК ГРИБОВ CANDIDA ALBICANS И CANDIDA TROPICALIS

**Н.В.Рыбалкин**

**Ключевые слова:** кандидамикоз; антиген; вакцина; терапия

*Candida* вызывает широкий диапазон инфекций: от незначительных заболеваний кожи и слизистых оболочек до инвазионных процессов, которые могут поражать практически все органы. Разработка вакцины против кандидамикоза является актуальным вопросом современной фармации и медицины. Суспензии клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis* подвергали действию ультразвука, фильтровали через мембрану «Владипор» МФА-МА №3 с размером пор 10 кДа, проводили предварительную и стерилизующую фильтрацию. Полученные стерильные очищенные антигены клеток грибов *Candida albicans* с концентрацией белка 3 мг/мл и *Candida tropicalis* с концентрацией белка 5 мг/мл смешивали в соотношении 1:1 с помощью мешалки. В эксперименте использовали двухмесячных белых мышей массой 18-22 г по 6 животных в контрольной и исследуемой группах. Животных заражали внутривенно суспензией грибов *Candida albicans* 20 млн клеток и *Candida tropicalis* 60 млн клеток в объеме 1 мл. Через 5 суток мышам внутримышечно вводили ассоциированные антигены клеток грибов *Candida* в объеме 0,2 мл. Через 14 суток повторяли эту процедуру. Животным в контрольной группе вводили стерильный изотонический раствор 0,9% натрия хлорида. После чего через 14 суток проводили осмотр животных и определяли результаты. Согласно результатам исследования установлено, что полученные ассоциированные антигены клеток грибов *Candida* обеспечивают терапевтический эффект у 100% животных при внутримышечном введении в объеме 0,2 мл.

## ПРАВИЛА ПІДГОТОВКИ МАТЕРІАЛІВ ДО ПУБЛІКАЦІЇ В ЖУРНАЛІ “ВІСНИК ФАРМАЦІЇ”

### Загальні положення

Журнал «Вісник фармації» публікує оригінальні статті, присвячені теоретичним та практичним досягненням у галузі фармації.

До розгляду приймаються оригінальні статті (до 10 сторінок), присвячені проблемам управління та економіки фармації, синтезу, аналізу, технології, дослідженню біологічної активності фізіологічно активних речовин та лікарських препаратів, експериментальній та клінічній фармакології, що містять теоретичні або експериментальні результати досліджень, які не були опубліковані раніше.

Статті, відіслані авторам на виправлення, повинні бути повернені до редакції не пізніше, ніж через 2 тижні після одержання. При перевищенні зазначеного строку рукопис буде перереєстрований як такий, що надійшов знову з відповідною зміною дати його виходу у світ. В авторській коректурі допускається виправлення лише помилок набору.

Статті повинні містити такі елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор, виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, яким присвячується означена стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням отриманих наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших розробок у даному напрямку.

### Представлення статей

Статті подаються до редакції у двох екземплярах і супроводжуються направленням від організації, в якій виконана робота, на ім'я головного редактора та експертним висновком, який дозволяє відкрити публікацію. Другий екземпляр статті підписується всіма авторами.

Автори статей, поданих до редакції для публікації в журналі, своїми особистими підписами на примірниках рукописів статей засвідчують:

- згоду на ведення редакцією обліку необхідних для обробки статей особистих даних авторів (ПІБ, учене звання, учений ступінь, посада та місце роботи, адреса для листування, робочий телефон, електронна пошта) з метою забезпечення відносин у сфері права інтелектуальної власності, в тому числі авторського права;
- дозвіл на публікацію особистих даних авторів (ПІБ, учене звання, учений ступінь, місце роботи, робочий телефон, електронна пошта) в журналі разом зі статтею;
- згоду на оприлюднення повної електронної версії статті (або рефератів статті) на сайтах Національного фармацевтичного університету, Національної бібліотеки України ім. В.І.Вернадського та інших порталах наукової періодики з обов'язковим зазначенням та збереженням особистих немайнових авторських прав.

До рукопису додається англomовний варіант статті для розміщення на сайті НФаУ.

До статті на окремому аркуші додаються відомості про авторів, які містять: учене звання, учений ступінь; прізвище, ім'я та по батькові (повністю); місце роботи та посаду, яку обіймає автор; адресу, номери телефонів і факсів, E-mail для листування.

Додатково необхідно вислати електронну версію рукопису (за адресою: [press@ukrfa.kharkov.ua](mailto:press@ukrfa.kharkov.ua))

### Оформлення рукописів

Текст статті друкується кеглем №14 через 1,5 інтервали на аркуші формату А4 (ширина полів: зліва – 3 см, справа – 1 см, зверху та знизу – по 2 см) і починається з таких даних: УДК, назви статті, ініціалів та прізвищ всіх

авторів, назви організацій, в яких виконана робота, переліку ключових слів (понять) у кількості 5-8 українською, російською, англійською мовами.

Автори повинні дотримуватись загального плану побудови статті.

1. Вступ. Містить постановку проблеми, короткий огляд раніше надрукованих робіт у досліджуваній галузі, зазначається актуальність тематики, мета роботи.

2. Експериментальна частина (Матеріали та методи). Містить описання використаних або розроблених методик, приладів та умов вимірювання. В хімічних методиках вказують кількість реагентів у мольних та масових одиницях (для каталізаторів – масу та мольні відсотки), об'єми розчинників, кількість та виходи одержаних сполук. Для всіх вперше синтезованих сполук повинні бути наведені дані елементного аналізу або мас-спектра високого розрізнення. В емпіричних брутто-формулах елементи розміщують за системою Chemical Abstracts: С, Н та далі згідно з латинським алфавітом.

3. Результати та їх обговорення. Містять результати досліджень, зроблених автором. Зміст роботи необхідно викладати ясно та стисло, уникаючи відомих положень, повторення результатів у тексті, таблицях і рисунках. Для хімічних сполук, вперше описаних у статті, або тих, що є основним об'єктом дослідження, крім формули наводиться повна назва згідно з номенклатурою IUPAC.

4. Висновки.

5. Перелік використаної літератури, розташованої за алфавітом (спочатку кирилиця, потім – латинський шрифт). Пристатейний список літератури повинен містити публікації за останні 10 років. Більш ранні публікації допускаються лише в особливих випадках; 60% літературних джерел повинні бути іноземною мовою (латиниця).

На кожен роботу у списку літератури повинна бути зроблена відсилка в тексті рукопису.

Стаття супроводжується трьома рефератами українською, російською та англійською мовами у вигляді розширеної анотації обсягом 200-220 слів. Реферати повинні містити індекс УДК, назву статті, ініціали та прізвища всіх авторів, назву установ (-и). Реферати мають бути інформативними (не містити лише загальні фрази), змістовними, структурованими (повторювати логіку описання результатів у статті), лаконічними і чіткими, з переконливими формулюваннями.

Формули сполук подаються окремими файлами у форматі Corel Draw 13; Chem Win, ISISdraw; діаграми та рисунки – у форматі Excel або Corel Draw 13; рисунки у вигляді фотографій можуть бути представлені файлами TIFF 300-600dpi Gray Scale (256 градацій сірого). Ширина графічного матеріалу повинна бути розміром 8,4 см або 17,4 см. Зображення на рисунках та в таблицях структурних формул небажане.

У статтях повинна використовуватись система одиниць СІ.

Рисунки та підписи до них виконують окремо один від одного; підписи до всіх рисунків статті подаються на окремому аркуші. На зворотному боці кожного рисунка простим олівцем вказується його номер та назва статті, а в разі необхідності – верх і низ.

Таблиці повинні бути надруковані на окремих аркушах і мати нумерацію і заголовки. На полях рукопису необхідно вказати місце розміщення рисунків і таблиць. Інформація, наведена у таблицях і на рисунках, не повинна дублюватися.

Рукописи, оформлені без дотримання вказаних правил, редакція не реєструє та не повертає авторам.

Передплатний індекс у каталозі «Укрпошта» для індивідуальних передплатників 74102, для підприємств – 74103.

# ЗМІСТ / CONTENTS / СОДЕРЖАНИЕ

АНОНС V МІЖНАРОДНОГО МЕДИЧНОГО ФОРУМУ .....	3
---	---

## ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

METHODOLOGY OF CREATING AN ENCAPSULATED DOSAGE FORM WITH BEE PRODUCTS. REPORT II / N.S.Bogdan, O.I.Tikhonov .....	4
Методологія створення капсульованих лікарських форм з продуктами бджільництва. Повідомлення II / Н.С.Богдан, О.І.Тихонов	
Методология создания капсулированных лекарственных форм с продуктами пчеловодства. Сообщение II / Н.С.Богдан, А.И.Тихонов	

BIOAVAILABILITY RESEARCH OF SOLID MEDICINAL FORMS BY THE EXAMPLE OF BISOPROLOL FUMARATE TABLETS IN RELATION TO THE BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION SYSTEM / S.M.Gureeva .....	10
Дослідження біодоступності твердих лікарських форм на прикладі таблеток бисопрололу фумарату відповідно до біофармацевтичної класифікаційної системи / С.М.Гурєєва	
Исследования биодоступности твердых лекарственных форм на примере таблеток бисопролола фумарата относительно биофармацевтической классификационной системы / С.Н.Гуреева	

РОЗРОБКА СКЛАДУ ЕМУЛЬСІЙНОЇ ОСНОВИ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІКАРСЬКОГО КОСМЕТИЧНОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ АНДРОГЕННІЙ АЛОПЕЦІЇ / І.О.Ярема, М.І.Федоровська .....	15
Development of the emulsion base composition when creating the medicinal cosmetic product used in androgenetic alopecia / I.O.Yarema, M.I.Fedorovska	
Разработка состава эмульсионной основы при создании лекарственного косметического средства для применения при андрогенной алопеции / И.О.Ярема, М.И.Федоровская	

ОБГРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ОСНОВИ З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ М'ЯКОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ / В.В.Шматенко .....	20
Substantiation of the base composition with the purpose of creation of a soft dosage form for treating a wound process / V.V.Shmatenko	
Обоснование состава основы с целью создания мягкого лекарственного средства для лечения раневого процесса / В.В.Шматенко	

## СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

THE REACTIVITY OF SUBSTITUTED 6,9-DICHLORACRIDINES / O.M.Sviechnikova, S.V.Kolesnyk, O.V.Kolesnyk .....	25
Реакційна здатність заміщених 6,9-дихлоракридинів / О.М.Свечнікова, С.В.Колісник, О.В.Колісник	
Реакционная способность замещенных 6,9-дихлоракридинов / Е.Н.Свечникова, С.В.Колесник, Е.В.Колесник	

SYNTHESIS, STRUCTURE AND RESEARCH OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METHYL ESTERS OF 6-NITRO-N-PHENILANTHRANILIC ACIDS / S.G.Isaev, H.O.Yeryomina, T.V.Zhukova, T.M.Kryuchkova, G.P.Zhegunova .....	29
Синтез, будова та дослідження фармакологічної активності метилових естерів 6-нітро-N-фенілантранілових кислот / С.Г.Ісаєв, Г.О.Єрьоміна, Т.В.Жукова, Т.М.Крючкова, Г.П.Жегунова	
Синтез, строение и исследование фармакологической активности метиловых эстеров 6-нитро-N-фенилантраниловых кислот / С.Г.Исаев, А.А.Еремина, Т.В.Жукова, Т.Н.Крючкова, Г.П.Жегунова	

CHEMICAL MODIFICATIONS OF 6-ALLYLSULFONYL-4-METHYL-1,2-DIHYDROQUINOLIN-2-ONE AS THE APPROACH FOR SEARCHING NEW BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES / T.O.Tsapko .....	34
Хімічні перетворення на основі 6-алілсульфоніл-4-метил-1,2-дигідрохінолін-2-ону з метою пошуку нових біологічно активних речовин / Т.О.Цапко	
Химические превращения на основе 6-аллилсульфонил-4-метил-1,2-дигидрохинолин-2-она с целью поиска новых биологически активных веществ / Т.А.Цапко	

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF N-[2-(BENZOYLAMINO)(2-OXOINDOLIN-3-YLIDENE)ACETYL]AMINO ACIDS ETHYL ESTERS / O.O.Altukhov .....	38
Синтез і властивості етилових естерів N-[2-(бензоїламіно)(2-оксоіндолін-3-іліден)ацетил]амінокислот / О.О.Алтухов	
Синтез и свойства этиловых эфиров N-[2-(бензоиламино)(2-оксоиндолин-3-илиден)ацетил]аминокислот / А.А.Алтухов	

INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN "APISED" CAPSULES BY THE METHOD OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY / O.S.Shpychak, O.I.Tikhonov .....	43
Дослідження складу активних фармацевтичних інгредієнтів капсул «Апісед» методом високоефективної рідинної хроматографії / О.С.Шпичак, О.І.Тихонов	
Исследование состава активных фармацевтических ингредиентов капсул «Аписед» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.С.Шпичак, А.И.Тихонов	

QUANTITATIVE DETERMINATION OF POTASSIUM HYDROGENPEROXOMONOSULFATE IN "ECOCID S" DISINFECTANT BY CATHODIC VOLTAMMETRY / M.Ye.Blazheyevskiy, O.O.Mozgova .....	48
Кількісне визначення гідрогенпероксомоносульфату калію у дезінфекційному засобі «Екоцид С» методом вольтамперометрії / М.Є.Блажеєвський, О.О.Мозгова	
Количественное определение гидрогенпероксомоносульфата калия в дезинфекционном средстве «Экоцид С» методом вольтамперометрии / Н.Е.Блажеевский, Е.А.Мозговая	

DETERMINATION OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF THE UV-SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF DOXYLAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION IN BLOOD IN THE VARIANT OF THE METHOD OF STANDARD / L.Yu.Klimenko, S.M.Trut, S.M.Poluyan .....	53
Визначення валідаційних характеристик УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення доксиламіну в крові у варіанті методу стандарту / Л.Ю.Клименко, С.М.Трут, С.М.Полуян	
Определение валидационных характеристик УФ-спектрофотометрической методики количественного определения доксиламина в крови в варианте метода стандарта / Л.Ю.Клименко, С.Н.Трут, С.М.Полуян	

THE STUDY OF THE VOLATILE OILS COMPOSITION OBTAINED FROM VEGETATIVE AND GENERATIVE ORGANS OF <i>BALLOTA NIGRA</i> L. / Yana S. Kolisnyk, Alla M. Kovaleva, Olga V. Goryacha .....	59
Дослідження складу ефірної олії вегетативних і генеративних органів <i>Ballota nigra</i> L. / Я.С.Колісник, А.М.Ковальова, О.В.Горяча	
Исследование состава эфирного масла вегетативных и генеративных органов <i>Ballota nigra</i> L. / Я.С.Колесник, А.М.Ковалева, О.В.Горячая	

## ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЕКОНОМІКА ФАРМАЦІЇ

MARKETING RESEARCH OF THE MARKET OF DRUGS WITH THE CHOLERETIC ACTION / L.O.Bobritskaya, M.A.Arakelyan, N.V.Popova .....	63
Маркетингові дослідження ринку препаратів жовчогінної дії / Л.О.Бобрицька, М.А.Аракелян, Н.В.Попова	
Маркетинговые исследования рынка препаратов желчегонного действия / Л.А.Бобрицкая, М.А.Аракелян, Н.В.Попова	

ANALYSIS OF THE DRUG ASSORTMENT FOR TREATING NICOTINE DEPENDENCE PRESENTED AT THE PHARMACEUTICAL MARKET OF UKRAINE / M.M.Kobets, Yu.M.Kobets .....	68
Аналіз асортименту препаратів, що сприяють відмові від тютюнопаління, представлених на фармацевтичному ринку України / М.М.Кобець, Ю.М.Кобець	
Анализ ассортимента препаратов, способствующих отказу от табакокурения, представленных на фармацевтическом рынке Украины / М.Н.Кобец, Ю.Н.Кобец	

RESEARCH OF PRIMARY DIRECTIONS OF THE PHARMACY SPECIALISTS SOCIAL PROTECTION IN UKRAINE ON THE BASIS OF SOCIAL PROTECTION IN THE EUROPEAN UNION / M.V.Zarichkova .....	73
Дослідження пріоритетних напрямків удосконалення соціального захисту спеціалістів фармації України на основі систем соціального захисту в ЄС / М.В.Зарічкова	
Исследования приоритетных направлений улучшения социальной защиты специалистов фармации Украины на основе систем социальной защиты в ЕС / М.В.Заричковая	

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФАРМАКОЛОГІЯ

THE STUDY OF THE THERAPEUTIC ACTION OF THE CELL-ASSOCIATED ANTIGENS OF <i>CANDIDA ALBICANS</i> AND <i>CANDIDA TROPICALIS</i> FUNGI / M.V.Rybalkin .....	78
Дослідження терапевтичної дії асоційованих антигенів клітин грибів <i>Candida albicans</i> та <i>Candida tropicalis</i> / М.В.Рибалкін	
Изучение терапевтического действия ассоциированных антигенов клеток грибов <i>Candida albicans</i> и <i>Candida tropicalis</i> / Н.В.Рыбалкин	

ПРАВИЛА ПІДГОТОВКИ МАТЕРІАЛІВ ДО ПУБЛІКАЦІЇ В ЖУРНАЛІ “ВІСНИК ФАРМАЦІЇ” .....	82
---	----

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, Національний фармацевтичний університет, редакція журналу “Вісник фармації”, тел./факс (57) 706-30-63; E-mail: press@ukrfa.kharkov.ua.  
Передплатні індекси: для індивідуальних передплатників — 74102; для підприємств — 74103.

Свідоцтво про державну реєстрацію серія КВ №14938-3910ПР від 04.02.2009 р.

Підписано до друку 06.06.2014 р. Формат 60x84 1/8. Папір офсетний. Друк ризографія.  
Умовн. друк. арк. 10,23. Обліков.-вид. арк. 11,87. Тираж 110 прим.

Літературні редактори О.Ю.Гурко, А.Л.Краснікова; комп’ютерна верстка О.М.Білінська.