

5. Saybel O.L. [et al.] Assessment of antioxidant activity of witloof chicory herb (*Cichorium intybus* L.). *Acta Biomedica Scientifica*. 2017; 2(2):85-88. DOI 10.12737/article_59a614fcd18c42.95236968 (in Russ.).
6. Rud N.K., Sampiev A.M., Davitavyan N.A. Main results of phytochemical and pharmacological research of *Nigella sativa* L. (review). *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*. 2013; 25(168):207-212 (in Russ.).
7. Kurkin, V.A. Comparative research of fatty acid composition and volatile components of fatty oils from seeds of *nigella sativa* and *argania spinosa*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021; 14(3):1586-1590. DOI: 10.5958/0974-360X.2021.00280.8. (in Russ.).
8. Mohammad R.K., Shoukhouh G., Mahmood S. Possible therapeutic effects of *Nigella sativa* and its thymoquinone on COVID-19. *Pharm Biol*. 2021; 59(1):696-703. DOI: 10.1080/13880209.2021.1931353 (in Engl.)
9. Aftab A. [et al.] *Nigella sativa* L. from traditional to contemporary medicine: a review. *International Journal of Biology and Biotechnology*. 2018; 15(2):237-254. (in Engl.)
10. Aftab A. [et al.] Pharmacological screening and GC-MS analysis of vegetative/reproductive parts of *Nigella sativa* L. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2020;33(5):2103-2111. DOI: 10.36721/PJPS.2020.33.5.REG.2103-2111.1(in Engl.)
11. He T., X. Xu The influence of *Nigella sativa* for asthma control: A meta-analysis. *Am J Emerg Med*. 2020;38:589-593. DOI: 10.1016/j.ajem.2019.11.036. (in Engl.)

УДК 615.322

© Д.О. Семакин, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, 2022

Д.О. Семакин, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова
**СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
 И СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ ГРУПП ВЕЩЕСТВ
 ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ ШИШЕК**
*ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
 Минздрава России г. Пермь*

Цель исследования. Исследование антиоксидантной активности экстракта шишек ели обыкновенной, полученного из сырья разных сроков заготовки.

Материал и методы. Объектом исследования являются ели обыкновенной шишки, заготовленные на территории Ильинского района Пермского края с июля 2020 по март 2021 г. Экстракты получали по запатентованной нами методике (патент №2756009 от 24.09.2021) и методике Государственной Фармакопеи 14-го издания. Для определения антиоксидантной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически по разработанной нами методике.

Результаты и обсуждение. Установлено, что наибольшая антиоксидантная активность наблюдается у экстрактов, полученных из сырья, заготовленного в период с сентября ($IC_{50} = 28,02 \pm 0,68$) по декабрь ($IC_{50} = 32,68 \pm 2,29$). Антиоксидантная активность экстракта, полученного по методике, описанной в патенте RU №2756009, достоверно выше показателей антиоксидантной активности экстракта, полученного по фармакопейной методике. Максимум накопления флавоноидов в шишках ели обыкновенной наблюдается в январе ($0,22 \pm 0,04\%$). Начиная с августа ($37,92 \pm 5,89\%$) наблюдается увеличение содержания окисляемых веществ.

Выводы. Полученные результаты показывают необходимость расширения сроков заготовки шишек ели обыкновенной для получения экстрактов с максимальным содержанием действующих веществ и наибольшей антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: ель обыкновенная, антиоксидантная активность, флавоноиды, окисляемые вещества.

D.O. Semakin, D.K. Gulyaev, V.D. Belonogova
**SEASONAL CHANGES IN THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND THE CONTENT
 OF THE MAIN GROUPS OF SUBSTANCES IN COMMON SPRUCE CONES**

Objective. The research of the antioxidant activity of the extract of the cones of the common spruce obtained from raw materials of different harvesting periods.

Material and methods. The object of the study are common spruce cones harvested on the territory of the Ilyinsky district of Perm Krai from July 2020 to March 2021. Extracts were obtained according to the procedure specified in the patent (№2756009 of 24.09.2021) and the methodology of the State Pharmacopoeia of the 14th edition. To determine the antioxidant activity, a reaction with a stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl was used. The content of flavonoids was determined spectrophotometrically according to the method developed by us.

Results and discussion. It was found that the greatest antioxidant activity is observed in extracts obtained from raw materials harvested in the period from September ($IC_{50} = 28.02 \pm 0.68$) to December ($IC_{50} = 32.68 \pm 2.29$). The antioxidant activity of the extract obtained by the method specified in the RU №2756009 patent is significantly higher than the antioxidant activity of the extract obtained by the pharmacopoeia method. The maximum accumulation of flavonoids in the cones of spruce is observed in January ($0.22 \pm 0.04\%$). Since August ($37.92 \pm 5.89\%$), there has been an increase in the content of oxidizable substances.

Conclusions. The results obtained show the need to extend the harvesting time of the common spruce cones to get extracts with the maximum content of active substances and the greatest antioxidant activity.

Key words: common spruce, antioxidant activity, flavonoids, oxidizable substances.

Ель обыкновенная (*Picea abies* L.) является широко распространенным древесным растением на территории Российской Федерации. На лесосеках после заготовки древесины остается огромное количество древесных отходов, которые являются источниками за-

грязнения и повышения риска возникновения лесных пожаров. Древесными отходами ели обыкновенной являются: кора, древесная зелень, корневая система и шишки. Шишки ели обыкновенной имеют богатый химический состав и могут рассматриваться в качестве

перспективного источника биологически активных веществ.

В настоящее время активно изучается состав биологически активных веществ шишек ели. Исследован состав и фармакологические свойства флавоноидов, полисахаридов, сапонинов, полифенолов и стильбенов, выделенных из шишек ели [6,7,8].

Водные извлечения из шишек *Picea abies* проявляют антиоксидантные свойства. Эта активность характерна для зеленых, зрелых и даже уже раскрывшихся шишек. Антиоксидантное действие преимущественно связано с содержанием полифенолов [9]. Мощный антиоксидантный эффект шишек ели обыкновенной может быть связан с содержанием стильбенов, в частности, производных пикекатаннол-о-гликозида. Среди экстрактивных веществ шишек *Picea abies* с сильным антиоксидантным действием являются производные кумаровой кислоты и гликозиды кемпферола [10].

Ранее нами была доказана выраженная антиоксидантная активность водного извлечения и сухого водного экстракта из шишек ели обыкновенной [1]. Следующим этапом являлись изучение влияния сроков заготовки сырья на содержание биологически активных веществ (БАВ), оказывающих антиоксидантную активность, и установление оптимальных сроков заготовки шишек с высоким содержанием БАВ.

Цель – исследование антиоксидантной активности экстракта шишек ели обыкновенной, полученного из сырья разных сроков заготовки.

Материал и методы

Объектом исследования явились ели обыкновенной шишки, заготовленные на территории Ильинского района Пермского края с июля 2020 года по март 2021 года.

Сухой водный экстракт получали по методике, описанной в патенте RU №2756009. Около 50 г шишек ели, измельченных до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, помещали в колбу, прибавляли 1,5 л воды (гидромодуль 1:30) и экстрагировали при перемешивании в течение 1,5 часа при нагревании 80-85°C. По окончании экстракции сырье отделяли от экстракта фильтрованием. Полученный экстракт сгущали под вакуумом при температуре 80-85°C в 10 раз от первоначального объема. Далее происходит отделение балластной, неактивной фракции путем охлаждения упаренного экстракта при температуре -18°C в течение 15 минут. При этом выпадает осадок, в который попадают с частью полисахаридного комплекса,

белки, дубильные и смолистые вещества. Осадок уплотняют центрифугированием и отбрасывают. Далее надосадочную жидкость выпаривают в вакуум-выпарном аппарате до густой массы и высушивают в сушильном шкафу при температуре 50°C [2].

Также был получен экстракт в соответствии с требованиями ОФС «Экстракты» [3]. В качестве экстрагента использовали воду очищенную.

Для определения антиоксидантной активности ели обыкновенной шишек экстракта сухого использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH) (Sigma-Aldrich, США, CAS номер: 1898-66-4).

К 1 мл разведения экстракта сухого шишек ели добавляли 3 мл раствора DPPH в 95% спирте этиловом в концентрации 5 мг/100 мл. В качестве контрольного образца измеряли оптическую плотность 3 мл раствора DPPH в 95% спирте этиловом в концентрации 5 мг/100 мл и 1 мл воды очищенной. Измерение проводили на спектрофотометре марки СФ 2000 при длине волны 517 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Далее вычисляли антиоксидантную активность и поглощение радикала по формуле:

Процент связывания радикала

$$DPPH = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$$

где A_0 – оптическая плотность контрольного образца при 517 нм;

A_x – оптическая плотность исследуемого образца при 517 нм.

Затем определяли величину IC_{50} – концентрацию вещества, способную связать половинную концентрацию радикала DPPH, мкг/мл. Величина IC_{50} определяется по кривой ингибирования, получаемой при построении графиков ингибирования в процентах от концентрации вещества [4].

Содержание окисляемых веществ проводили методом согласно ГФ 14-го издания 1 [5].

Определение суммы флавоноидов проводили по разработанной нами методике для шишек ели обыкновенной. Навеску сырья 3,0 (точная навеска) с размером частиц, проходящих сквозь фильтр с отверстиями диаметром 1мм помещали в коническую колбу на 100 мл с притертой пробкой, заливали рассчитанным количеством спирта этилового 50%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 минут, поддерживая слабое кипение. Полученные извлечения

фильтровали в мерную колбу на 50 мл через бумажный фильтр и доводили до метки тем же спиртом. Аликвоту 3 мл помещали в мерную колбу на 25 мл, добавляли 3 мл алюминия хлорида 2% и доводили тем же растворителем до метки. Далее измеряли оптическую плотность через 30 минут на спектрофотометре марки СФ2000 в пересчете на цинарозид при 398 нм. Расчет содержания флавоноидов (в %) проводили по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 1 \times 100 \times 100}{A_0 \times a \times 3 \times (100 - W)}$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора при 398 нм; А₀ – оптическая плотность СО цинарозида при 398 нм; а – навеска исследуемого вещества, г; а₀ – навеска СО цинарозида, г; 1 и 3 – аликвота 1 мл и 3 мл соответственно; 25 и 100 – объёмы мерных колб для разведения цинарозида.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием «Microsoft Excel, 2019» методом описательной статистики.

Результаты и обсуждение

Антиоксиданты – это вещества, препятствующие окислению. В живом организме ведущим фактором окисления является образование свободных радикалов, поэтому действие антиоксидантов в биологических системах рассматривается преимущественно с позиции предотвращения окисления органических веществ свободными радикалами. Поэтому было важно выявить период с наибольшей антиоксидантной активностью (АО). Нами были получены экстракты шишек ели обыкновенной из образцов сырья заготовленного в разные сезоны года. Определяли IC₅₀. Величина IC₅₀ – концентрация вещества, способная связать половинную концентрацию радикала DPPH, определяемая по кривой ингибирования получаемой при построении графиков ингибирования в процентах от концентрации вещества. Результаты определения представлены в табл. 1.

По результатам исследования установлено, что максимум антиоксидантной активности наблюдается у экстрактов, полученных из сырья, заготовленного в период с сентября по декабрь (табл. 1). Наименьший показатель антиоксидантной активности выявлен у июльского образца. Также было установлено, что, начиная с августа, антиоксидантная (АО) активность экстракта достоверно увеличивается.

Представляет интерес установить АО активность у экстракта, полученного по общим

правилам ГФ 14, и экстракта, полученного стадией холодного осаждения. В качестве препарата сравнения использовали субстанцию аскорбиновой кислоты, антиоксидантные свойства которой широко известны. Результаты представлены на рисунке.

Таблица 1
Сезонные изменения антиоксидантной активности экстракта ели обыкновенной шишек

Месяц заготовки сырья	Антиоксидантная активность в IC ₅₀	P-value к июльскому образцу
Июль	57,13±5,08	-
Август	39,18±5,59*	0,0149
Сентябрь	28,02±0,68*	0,0091
Октябрь	26,20±4,99*	0,0017
Декабрь	28,34±1,47*	0,0066
Январь	31,95±1,99*	0,0068
Февраль	32,68±2,29*	0,0061
Март	32,31±3,05*	0,0040

* Статистически значимое различие (p < 0,05) по отношению к июльскому образцу.

Установлено, что антиоксидантная активность при использовании варианта получения экстракта по предлагаемому способу достоверно выше, чем у экстракта, полученного по ГФ 14, без стадии холодного осаждения.

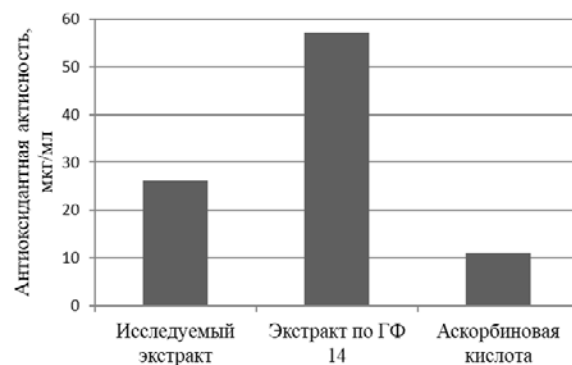


Рис. Антиоксидантная активность экстрактов ели обыкновенной шишек

Антиоксидантная активность лекарственного растительного сырья обусловлена содержанием разных групп биологически активных веществ (БАВ), среди которых основная роль принадлежит фенольным соединениям (флавоноиды, дубильные вещества).

Поэтому нами проведены исследования по определению содержания групп БАВ в экстрактах, полученных из сырья разных сроков заготовки, для выявления их максимума и установления сроков заготовки сырья, богатого данными группами БАВ.

Исследование содержания суммы окисляемых веществ, проводили по стандартной фармакопейной методике 1 [5]. Результаты исследования представлены в табл. 2.

В результате проведенного исследования было выявлено, что, начиная с августа, наблюдается увеличение содержания окисляемых веществ в экстракте. Содержание суммы окисляемых ве-

ществ в образцах экстракта, полученного из сырья, заготовленного в октябре и январе, не имеет достоверных отличий от июльского образца.

Таблица 2
Сезонные изменения содержания суммы окисляемых веществ в экстракте из ели обыкновенной шишек разных сроков заготовки

Месяц заготовки сырья	Содержание окисляемых веществ, %	P-value к июльскому образцу
Июль	24,58±6,57	-
Август	37,92±5,89*	0,0397
Сентябрь	49,18±9,21*	0,0200
Октябрь	32,32±0,64	0,1776
Декабрь	39,81±7,82*	0,0252
Январь	35,58±2,35	0,0932
Февраль	49,95±7,75*	0,0132
Март	43,23±1,89*	0,0345

* Статистически значимое различие ($p < 0,05$) по отношению к июльскому образцу.

Таблица 3
Динамика содержания флавоноидов в ели обыкновенной шишках

Месяц заготовки сырья	Содержание флавоноидов, %
Июль	0,06±0,01
Август	0,16±0,01
Сентябрь	0,12±0,01
Октябрь	0,07±0,01
Декабрь	0,11±0,01
Январь	0,22±0,04
Февраль	0,14±0,03
Март	0,1±0,01

Для установления содержания флавоноидов проведено исследование образцов сырья, собранного с июля по март. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Максимум накопления флавоноидов в шишках ели обыкновенной наблюдается в январе, наименьшее содержание флавоноидов – в июле и октябре. Среднее содержание флавоноидов в экстракте ели обыкновенной шишек составило $0,98 \pm 0,04\%$.

Заключение

Таким образом, установлено, что наибольшая антиоксидантная активность наблюдается у экстрактов, полученных из сырья, заготовленного в период с сентября по декабрь. В период с сентября по март в ели обыкновенной шишках также увеличивается содержание суммы окисляемых веществ и флавоноидов. Эти данные свидетельствуют о необходимости расширения сроков заготовки ели обыкновенной шишек для получения экстрактов с максимальным содержанием действующих веществ.

Установлено, что антиоксидантная активность при использовании технологии получения экстракта с холодной стадией достоверно выше.

Сведения об авторах статьи:

Семакин Дмитрий Олегович – аспирант кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. E-mail: semakin.dima98@gmail.com.

Гуляев Дмитрий Константинович – к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. E-mail: dkg2014@mail.ru.

Белогова Валентина Дмитриевна – д.фарм.н., завкафедрой фармакогнозии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. E-mail: belonogovavd@yandex.ru.

ЛИТЕРАТУРА

- Семакин, Д.О. Антиоксидантная активность отвара и сухого экстракта ели обыкновенной шишек / Д.О. Семакин, Д.К. Гуляев // Во имя жизни и здоровья: материалы 72-й Международной научно-практической конференции. – Пятигорск, 2019. – С. 293-298.
- Способ получения средства, обладающего противовоспалительной активностью: пат. №2756009 Рос. Федерация; заявл. 19.08.2020; опубл.: 24.09.2021. Бюл. № 27. – 3 с.
- ОФС 1.4.1.0021.15. «Экстракты» [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации 14 изд. Т. 2. – URL: <http://www.femb.ru> (дата обращения: 10.02.22)
- Гуляев, Д.К. Состав и антиоксидантная активность экстракта корней ели обыкновенной / Д.К. Гуляев [и др.] // Химия растительного сырья. – 2020. – №4. – С. 195-202. DOI: 10.14258/jcprtm.2020047676
- ОФС 1.5.3.008.18. «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [Электронный ресурс] // Государственная фармакопея Российской Федерации 14 изд. Т. 2. – URL: <http://www.femb.ru> (дата обращения: 10.02.22)
- Gulsoy, S.K. Kraft pulping properties of european black pine cone / S.K. Gulsoy, F. Ozturk // Maderas Cienc. Y Tecnol. – 2015. – Vol. 17, №4. – P. 875-882.
- Antioxidant capacity and tentative identification of polyphenolic compound of cones of selected coniferous species / T. Hofmann [et al.] // Acta Silvatica et Lignaria Hungarica. – 2020. – Vol. 16, №2 – P. 79-94.
- Kupeta, A.J. Kinetics and equilibrium study of 2-nitrophenol adsorption onto polyurethane cross-linked pine cone biomass / A.J. Kupeta, E.B. Naidoo, A.E. Ofomaja // J. Clean. Prod. – 2018. – Vol. 179. – P. 191-209. Doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.034
- Hofman, T. Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays / T. Hofman, E. Visi-Rajczi, A. Levente // Industrial Crops and Products. – 2019. – Vol. 145:111935. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111935
- Antioxidant and Antibacterial Properties of Norway Spruce (*Picea abies* H. Karst.) and Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière) Cone Extracts / T. Hofmann [et al.] // Forests. – 2021. – Vol. 12, №9. – P. 1189-1211. Doi: 10.3390/f12091189.

REFERENCES

- Semakin, D.O., Gulyaev D.K. Antioksidantnaya aktivnost' otvara i sukhogo ekstrakta eli obyknovennoi shishek (Antioxidant activity of decoction and dry extract of spruce cones). Vo imya zhizni i zdorov'ya: materialy 72-i Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Pyatigorsk. 2019:293-298. (in Russ.).
- Sposob polucheniya sredstva, obladajushhego protivovospalitel'noj aktivnost'ju (A method for obtaining a drug with anti-inflammatory activity): pat. №2756009 Ros. Federacija; zayavl. 19.08.2020; opubl.: 24.09.2021. Bjul. № 27. 3 s. (in Russ.).
- OFS 1.4.1.0021.15. «Ekstrakty» [Elektronnyi resurs]. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii 14 izd. Vol 2.URL: <http://www.femb.ru> (date of application: 10.02.22) (in Russ.).

4. Gulyaev D. K., Belonogova V. D., Bokov D. O., Bessonov V. V. The composition and antioxidative activity of spruce roots' extract. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2020;4:195–202. doi: 10.14258/jcprm.2020047676 (in Russ.)
5. OFS 1.5.3.008.18. «Opredelenie soderzhaniya dubil'nykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh» (Determination of the content of tannins in medicinal plant raw materials and medicinal plant preparations) [Elektronnyi resurs]. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii 14 izd. Vol 2. URL: <http://www.femb.ru> (date of application: 10.02.22) (in Russ.)
6. Gulsoy S.K., Ozturk F. Kraft pulping properties of european black pine cone. *Maderas Cienc. Y Tecnol.* 2015;17(4):875–882. (in Engl.).
7. Hofmann T., [et al.] Antioxidant capacity and tentative identification of polyphenolic compound of cones of selected coniferous species. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*. 2020;16(2):79–94. (in Engl.).
8. Kupeta A.J., Naidoo E.B., Ofomaja A.E. Kinetics and equilibrium study of 2-nitrophenol adsorption onto polyurethane cross-linked pine cone biomass. *J. Clean. Prod.* 2018;179: 191–209. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.034 (in Engl.).
9. Hofman T., Visi-Rajczi E., Levente A. Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays. *Industrial Crops and Products*. 2019;145:111935. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111935 (in Engl.).
10. Hofmann T. [et al.] Antioxidant and Antibacterial Properties of Norway Spruce (*Picea abies* H. Karst.) and Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière) Cone Extracts. *Forests*. 2021;12(9):1189–1211. doi: 10.3390/f12091189 (in Engl.).

УДК 615.074

© Ю.А. Труханова, Г.М. Алексеева, И.П. Яковлев, 2022

Ю.А. Труханова, Г.М. Алексеева, И.П. Яковлев
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 ДЛЯ АТТЕСТАЦИИ ПЕРВИЧНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА
 НОВОГО АНАЛЬГЕЗИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА -
 1-(ФЕНИЛ[ФЕНИЛИМИНО]МЕТИЛ)ПИРРОЛИДИН-2,5-ДИОНА**
*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический
 университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург*

Цель. В статье представлен подход к разработке методики количественного определения для аттестации первичного стандартного образца нового анальгезирующего средства – 1-(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-диона (ФФМП) путем титрования по методу Кьельдаля. Ввиду неспецифичности данного метода и большой вероятности наличия в аттестуемой субстанции азотсодержащих примесей было предложено провести очистку аттестуемого вещества до максимально возможной степени чистоты. Для подтверждения чистоты субстанции была разработана и валидирована методика анализа по показателю «Предельное содержание родственных примесей» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материал и методы. Хроматографическое разделение на фазах ацетонитрил / 0.15% водный раствор муравьиной кислоты (pH 2.5) в градиентном режиме на колонке Tosoh ODS (4,6×250 мм, 5 мкм) со скоростью потока 1,0 мл/мин достигалось за 35 минут. Регистрация сигнала осуществлялась с помощью многоволнового УФ-детектора при длине волны 257 нм.

Выводы. С помощью валидированной методики было доказано, что чистота субстанции составляет 100,0%. По методу Кьельдаля проведена количественная оценка содержания основного вещества в очищенной субстанции ФФМП, аттестованное значение его составило 99,7±0,2%.

Ключевые слова: 1-(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-дион, метод Кьельдаля, стандартный образец, аттестация, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Yu.A. Trukhanova, G.M. Alekseeva, I.P. Yakovlev
**DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE DETERMINATION METHODOLOGY
 FOR THE CERTIFICATION OF THE PRIMARY STANDARD SAMPLE
 OF A NEW ANALGESIC AGENT –
 1-(PHENYL[PHENYLIMINO]METHYL)PYRROLIDINE-2,5-DIONE**

Aim. The article presents an approach to the development of a quantitative determination technique for the certification of the primary standard sample of a new analgesic agent – 1-(phenyl[phenylimino]methyl)pyrrolidine-2,5-dione (PPMP) by titration using the Kjeldahl method. Due to the non-specificity of this method and the high probability of the presence of nitrogen-containing impurities in the substance certified, it was proposed to purify the substance certified to the maximum possible degree of purity. To confirm the purity of the substance, a method of analysis for the indicator "Limit content of related impurities" with high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated.

Material and methods. Chromatographic separation in acetonitrile / 0.15% aqueous formic acid solution (pH 2.5) phases in gradient mode on a Tosoh ODS column (4,6×250 mm, 5 microns) with a flow rate of 1.0 ml/min was achieved in 35 minutes. The signal was recorded using a multi-wave UV detector at a wavelength of 257 nm.

Conclusions. Using a validated technique, it was proved that the purity of the substance is 100.0%. According to the Kjeldahl method, a quantitative assessment of the content of the main substance in the purified FFMP substance was carried out, its certified value was 99.7 ± 0.2%.

Key words: 1-(phenyl[phenylimino]methyl)pyrrolidine-2,5-dione, Kjeldahl method, standard sample, certification, high performance liquid chromatography.

Разработка новых биоактивных молекул является актуальным вопросом развития сферы здравоохранения. Решение данной нетривиальной задачи требует большого количества ресурсов. В силу этого актуальна минимизация ошибок, связанных с ложной интер-

претацией начальных данных, для дальнейшего этапа разработки. Если пройдены первые этапы разработки и проведен целенаправленный синтез новой биоактивной молекулы, разработчики сталкиваются с проблемой отсутствия стандартных образцов для аналити-