








Н.Е. Кузьмина 
С.В. Моисеев  
Е.Ю. Северинова 
А.И. Лутцева 

Применение метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для анализа полисахаридов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация




✉ Моисеев Сергей Владимирович; MoiseevSV@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Метод диффузионно-упорядоченной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (DOSY) является разновидностью транспортных методов, используемых в аналитической химии. Он основан на экспериментальном фиксировании трансляционной подвижности молекул при термодинамическом равновесии в растворе, которая количественно характеризуется коэффициентом самодиффузии. Цель работы — обобщение основных направлений использования метода DOSY для анализа природных и модифицированных природных полисахаридов, применяемых в фармацевтике и фармацевтической биотехнологии. В обзоре показано, что этот метод является действенным инструментом для мониторинга фракционирования при выделении полисахаридов из природной смеси, оценки их средней молекулярной массы и молекулярно-массового распределения, изучения образования супрамолекулярных систем на основе полисахаридов. Описаны основные проблемы прецизионного измерения коэффициента самодиффузии макромолекул полисахаридов, приведены поправочные коэффициенты для нивелирования ошибок, связанных с колебаниями температуры и вязкости растворов. С помощью понятия полифазности дано объяснение экспериментально наблюдаемому разбросу значений коэффициентов самодиффузии ядер макромолекулы узкодисперсного полимера. Показаны способы характеристики трансляционной подвижности полифазной полимерной макромолекулы как единого целого. Обобщены значения параметров импульсных градиентных последовательностей, используемых при количественных измерениях коэффициентов самодиффузии линейных, малоразветвленных и разветвленных полисахаридов.

Ключевые слова: диффузионно-упорядоченная спектроскопия ядерного магнитного резонанса; полисахариды; средняя молекулярная масса; коэффициент самодиффузии; природные экстракты; супрамолекулярные системы

Для цитирования: Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Северинова Е.Ю., Лутцева А.И. Применение метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для анализа полисахаридов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(1):24–40. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-24-40>

N.E. Kuz'mina 
S.V. Moiseev  
E.Yu. Severinova 
A.I. Luttseva 

Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy Application for Analysis of Polysaccharides

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ **Sergey V. Moiseev**; MoiseevSV@expmed.ru

ABSTRACT

Diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy (DOSY) is a molecular transport method in analytical chemistry, based on experimental recording of the molecules' translational mobility at thermodynamic equilibrium in a solution. The translational mobility is characterised quantitatively by a self-diffusion coefficient. The aim of the study was to summarise the main trends in application of DOSY for the analysis of natural and modified natural polysaccharides used in pharmaceuticals and pharmaceutical biotechnology. The review shows that this method is an effective instrument for monitoring fractionation during isolation of polysaccharides from a natural mixture, for estimating their average molecular weight and molecular weight distribution, and for studying the formation of supramolecular systems based on polysaccharides. The paper describes main issues of the precise measurement of polysaccharide macromolecules self-diffusion coefficients and provides the correction factors to compensate for errors caused by fluctuations in temperature and viscosity of solutions. The observed scatter of self-diffusion coefficients of narrowly dispersed polymer macromolecules nuclei is explained using the polyphase concept. The paper illustrates ways of describing translational mobility of a polyphase polymer macromolecule as a whole. The authors summarise values of the gradient pulse sequence parameters used in quantitative measurements of self-diffusion coefficients of linear, low-branched, and branched polysaccharides.

Key words: diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy; polysaccharides; average molecular weight; self-diffusion coefficient; natural extracts; supramolecular systems

For citation: Kuz'mina N.E., Moiseev S.V., Severinova E.Yu., Luttseva A.I. Diffusion-ordered NMR spectroscopy application for analysis of polysaccharides. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(1):24–40. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-24-40>

Список сокращений

COSY — корреляционная спектроскопия (correlation spectroscopy)
DQF-COSY — корреляционная спектроскопия с двухквантовой фильтрацией (double quantum filtered correlation spectroscopy)
TOCSY — полная корреляционная спектроскопия (total correlation spectroscopy)
NOESY — ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (nuclear Overhauser effect spectroscopy)
ROESY — ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера во вращающейся системе координат (rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy)
HSQC — гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy)

HMBC — гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия (heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy)
DOSY — диффузионно-упорядоченная спектроскопия ЯМР (diffusion-ordered NMR spectroscopy)
HPSEC — высокоэффективная эксклюзионная гель-проникающая хроматография (high-performance size-exclusion chromatography)
AsFFFF — асимметричное фракционирование потока по полю (asymmetric flow field-flow fractionation)
MALDI-TOF MS — времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)

Введение

Природные полисахариды и их производные широко используются в биотехнологии и фармацевтике. Являясь активными биосовместимыми системами, они оказывают противоопухолевое, противовирусное, антисклеротическое, антиоксическое действие, стимулируют кроветворение и иммуногенез, неспецифическую резистентность к лучевым поражениям, положительно влияют на течение воспалительного процесса, повышают устойчивость клеточных мембран, усиливают регенерацию тканей, активируют гипоталамо-адреналовую систему, используются в качестве кровезаместителей [1–10]. Как правило, полисахариды низкотоксичны, не вызывают пирогенные реакции и сенсибилизацию. Большим биоинженерным потенциалом обладают биodeградируемые полисахариды. На их основе изготавливают биомембраны, гидрогели, матрицы, микро/наносферы, которые широко используются при создании инновационных продуктов медицинского применения в качестве супрамолекулярных носителей для контролируемого высвобождения лекарственных средств. За счет набухания и биodeградации полисахаридов достигается дозированное высвобождение импрегнированного в нем лекарственного средства [11].

Биологическая активность полисахаридов, а также их физико-химические свойства, метаболизм и экскреция зависят от размера и, как следствие, от средней молекулярной массы (ММ) полимера [1–3, 9, 12–16]. Определение ММ является актуальной задачей, которая в настоящее время решается с помощью различных физических и физико-химических методов: осмометрии, вискозиметрии, ультрацентрифугирования, лазерной фотометрии светорассеяния, высокоэффективной эксклюзионной гелепроникающей хроматографии, асимметричного фракционирования потока по полю, времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

Перспективным методом определения ММ полимеров является метод диффузионно-упорядоченной спектроскопии ядерного магнитного резонанса (Diffusion-Ordered Spectroscopy, DOSY). Метод DOSY является разновидностью транспортных методов в аналитической химии, основанных на экспериментальном фиксировании транспортной подвижности молекул соединений в растворе под действием некоторой силы. В случае DOSY фиксируется трансляционная

подвижность молекул при термодинамическом равновесии – самодиффузия [17–19]. Широкое внедрение метода DOSY в аналитическую практику началось в середине 1990-х годов, когда градиентные модули стали неотъемлемой частью спектрометров ЯМР и у исследователей появилась возможность связать между собой спектральную и диффузионную информацию.

Цель работы – обобщение основных направлений использования метода DOSY для анализа природных и модифицированных природных полисахаридов, применяемых в фармацевтике и фармацевтической биотехнологии.

Теоретические аспекты определения молекулярной массы полисахаридов методом DOSY

Самодиффузия молекулярных объектов (молекул, макромолекул, молекулярных комплексов, супрамолекулярных систем) количественно характеризуется коэффициентом самодиффузии (D), который численно равен среднеквадратичному смещению молекулы за единицу времени. В методе DOSY смещение молекулы определяют путем двойного кодирования ее пространственного положения с помощью импульса градиента магнитного поля за определенный интервал времени, называемый временем диффузии.

В основе определения молекулярной массы методом DOSY лежат две функциональные зависимости: уравнение Стокса–Эйнштейна и скейлинговое соотношение Флори. Уравнение Стокса–Эйнштейна устанавливает зависимость коэффициента самодиффузии от размера молекулы и условий эксперимента¹ [20]:

$$D = kT / 6\pi\eta R_h, \quad (1)$$

где k – постоянная Больцмана (Дж/К), T – абсолютная температура (К), η – вязкость раствора (Па·с), R_h – гидродинамический радиус (м).

Значение R_h складывается из собственно радиуса диффундирующей частицы и толщины сольватной оболочки. При исследовании самодиффузии частиц, форма которых отличается от сферической, R_h трактуется как средний гидродинамический радиус сферы, которая при прочих равных условиях имеет тот же D в заданном растворе, что и исследуемый объект.

¹ Воробьев АХ. Диффузионные задачи в химической кинетике. Учебное пособие. М.: Изд. Московского университета; 2003.

Скейлинговое соотношение Флори устанавливает степенную зависимость между линейным размером молекулы и ее молекулярной массой [21]:

$$R \sim MM^\alpha, \quad (2)$$

где R — линейный размер молекулярного объекта, MM — его молекулярная масса, α — параметр, определяемый формой молекулярного объекта.

Из зависимостей (1) и (2) следует, что при постоянных температуре, растворителе, концентрации раствора, однотипности формы и невалентных взаимодействий молекулярных объектов количественная зависимость коэффициента самодиффузии от молекулярной массы будет иметь вид степенной функции:

$$D = K \times MM^\alpha, \quad (3)$$

где K и α — числовые константы, зависящие от топологии полимера, вязкости раствора и температуры.

DOSY-спектр представляет собой двумерный спектр с дисперсией сигналов по шкале химических сдвигов (δ) и по шкале D , поэтому он позволяет устанавливать строение отдельных компонентов смесей без их разделения. Как следствие, DOSY называют виртуальной хроматографией [22]. Если компоненты смеси имеют близкое строение, сигналы молекул этих компонентов, перекрывающиеся по шкале δ , разделятся в DOSY-спектре по оси ординат в соответствии с величинами D . В качестве примера на рисунке 1а приведен ^1H спектр водного раствора смеси двух декстранов с молекулярными массами

1 и 670 кДа. Так как образцы декстранов имеют одинаковое строение и различаются только числом мономерных звеньев в полимерной цепи, то наблюдается полное перекрывание их сигналов в спектре. В DOSY спектре (рис. 1b) сигналы декстранов, полученные в этом же растворе, расходятся по шкале D , так как их макромолекулы различаются по размеру и величине MM .

Необходимо отметить, что величина D зависит не только от физико-химических свойств исследуемого объекта, но и от параметров импульсной градиентной последовательности. Это следует из аналитической функции Стейскала–Таннера, аппроксимирующей зависимость амплитуды сигнала спинового эха от параметров импульса градиента магнитного поля [23]:

$$I(\delta, \Delta) = I_0 \exp[-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) - R], \quad (4)$$

где I и I_0 — амплитуды сигнала спинового эха в присутствии и отсутствие импульса градиента магнитного поля, Δ — время диффузии (мс), δ — длительность градиентного импульса (мс), γ — гиромагнитное отношение ($\text{Гц}\cdot\text{Тл}^{-1}$), g — величина градиента ($\text{Тл}\cdot\text{м}^{-1}$), R — релаксационный фактор.

В связи с этим подбор оптимальных параметров импульсной градиентной последовательности, позволяющий корректно оценивать MM молекулярного объекта, является важным этапом DOSY эксперимента.

На точность измерения величины D также влияет алгоритм выбранной импульсной градиентной последовательности. Основными факторами, которые приводят к существенной

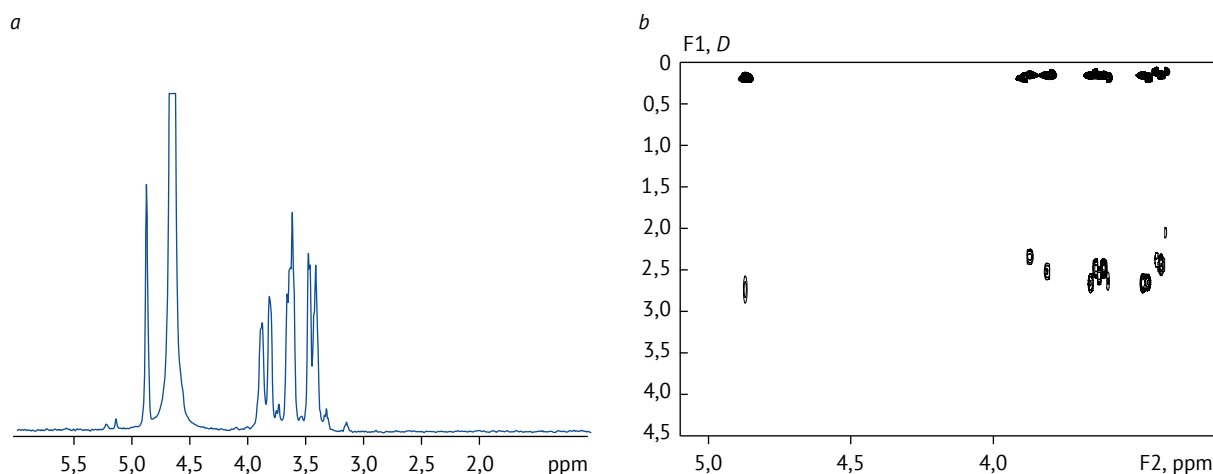


Рис. 1. Спектры ^1H (a) и DOSY (b) водного раствора смеси декстранов (молекулярные массы 1 и 670 кДа)

Fig. 1. ^1H (a) and DOSY (b) spectra of the aqueous solution of the dextrans mixture (MMs of 1 and 670 kDa)

ошибке при измерении D , являются конвекционные потоки, возникающие из-за неравномерного разогрева образца в ампуле, неоднородность импульсов градиента магнитного поля и вихревые токи Фуко, вызванные импульсом градиента магнитного поля. Они подробно описаны в обзоре [24]. Хотя природа возникновения этих потоков хорошо известна, существующие в настоящий момент инструментальные решения не позволяют преодолеть их полностью. Для того чтобы избежать некорректных выводов, особенно при численной интерпретации результатов, предпочтение отдают тем алгоритмам импульсной последовательности, которые обеспечивают минимизацию влияния указанных факторов на детектируемый сигнал спинного эха. Некоторые из них представлены в обзоре [25]. Кроме того, для нивелирования ошибок, связанных с колебаниями температуры и вязкости, применяют метод внутреннего эталона [26]. При использовании этого метода параметры импульсной градиентной последовательности подбирают таким образом, чтобы воспроизводилось справочное значение D внутреннего стандарта, присутствующего в растворе исследуемого образца.

Метод DOSY используется для оценки ММ на качественном и количественном уровне. На качественном уровне его применяют при анализе сложных многокомпонентных смесей и супрамолекулярных систем, когда абсолютные величины D компонентов не имеют значения, главное, чтобы наблюдалась их дисперсия по шкале ординат в DOSY спектре. Количественный уровень предполагает прецизионную оценку величины ММ.

Анализ многокомпонентных смесей полисахаридов

Метод DOSY является действенным инструментом для компонентного анализа различных фракций экстрактов природного сырья, для контроля фракционирования при выделении полисахаридов из природной смеси и для определения чистоты выделенного полисахарида. Например, в работе [27] методом DOSY изучен полисахаридный состав различных фракций экстракта листьев и стеблей лекарственного растения *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng. Строение компонентов экстракта было установлено с использованием комплекса химических, ферментативных, хроматографических и спектральных методов. Авторы работы [28] изучали экстракт лекарственного растения

Chlorophytum borivilianum Santapau et R.R. Fern. и доказали, что его полисахаридная фракция препятствует старению организма и увеличивает продолжительность жизни. Методом DOSY было установлено, что она содержит только один компонент с ориентировочным значением ММ 1 кДа. Большой интерес вызывают полисахариды, выделяемые из экстрактов грибов, так как они обладают противоопухолевой активностью и оказывают иммуномодулирующее действие [29]. В работе [30] проведен анализ экстракта мицелия гриба *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Одна из задач исследования заключалась в определении числа компонентов полисахаридной фракции экстракта. В результате эксперимента DOSY было установлено, что данная фракция представляет собой смесь из двух компонентов с различной ММ. В работе [31] метод DOSY был использован для анализа экзополисахаридов, входящих в состав литобионтных (микроколониальных) грибов *Knufia petricola* A95. По величинам значений $\lg D$ авторы разделили все полисахариды на пуллуланы и галактофуromanнаны. Авторы работы [32] с помощью метода DOSY усовершенствовали методологию быстрого мониторинга фракционирования сырых экстрактов и оценки путей очистки индивидуальных полисахаридов. В качестве тестовых образцов они использовали экстракты грибов *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. и *Leatiporus sulphureus* (Bull.) Murr.

Следует отметить, что компонентный состав фракций может быть установлен при очень низких уровнях концентраций. Так, авторы работы [33], изучая методом DOSY различные фракции ферментативного расщепления эритропозтина и овальбумина, показали, что достоверные спектральные данные для компонентного анализа могут быть получены при концентрациях ниже 30 мкмоль/л. При этом компоненты фракционирования могут иметь одинаковые ММ и лишь незначительно различаться по форме молекул. Например, в публикации [34] представлены результаты успешного применения метода DOSY для разделения α - and β -аномерных изомеров различных углеводов (арбутина, фенил-глюкопиранозид, D-глюкопиранозы, D-галактопиранозы, D-маннопиранозы, целлобиозы). Характерно, что в большинстве исследований природных смесей компонентный анализ методом DOSY проводят одновременно с идентификацией строения этих компонентов с помощью комплекса традиционных методов ЯМР (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HMBC и т.д.).

Оценка методом DOSY образования супрамолекулярных систем с участием полисахаридов

Метод DOSY является одним из самых надежных методов оценки образования супрамолекулярных систем, когда отдельные молекулы различных соединений связываются межмолекулярными невалентными взаимодействиями в единое целое. Среди супрамолекулярных систем выделяют комплексы включения «хозяин»–«гость», в которых молекулы «хозяина», имеющие внутримолекулярные полости, связывают молекулу или фрагмент макромолекулы «гостя», размещающиеся в этой полости. В качестве «хозяев» часто выступают циклодекстрины (CD) – циклические олигомеры глюкозы, содержащие в своем составе различное число D-(+)-глюкопиранозных фрагментов (6, 7 и 8 в α -, β - и γ -CD соответственно). Различие в размерах полости α -, β - и γ -CD обуславливает специфичность их связывания с «гостями». Интерес к комплексам включения на основе CD обусловлен тем, что они обладают свойствами, отличными от свойств свободных «гостей» и «хозяина» (измененные растворимость, летучесть, стабильность, химическая реактивность и биодоступность) [35–37].

Первые публикации по применению метода DOSY для оценки эффективности образования комплексов включения с участием циклодекстринов появились в начале 80-х годов прошлого века. Основопологающей является работа [38], авторы которой изучали связывание нормальных спиртов (от метанола до октанола) с α - и β -CD. Они предложили оценивать долю молекул «гостя», связанных с полостью «хозяина» (ρ), с помощью величин D молекул CD и «гостя» (субстрата) исходя из того, что самодиффузия свободных молекул «хозяина» и «гостя» в их смеси не зависит от диффузии других компонентов, в то время как в комплексе включения подвижность молекулы «гостя» (и, как следствие, D) уменьшается. Для расчета ρ была предложена формула:

$$\rho = (D_s^{\text{free}} - D_s^{\text{obs}}) / (D_s^{\text{free}} - D_s^{\text{bound}}), \quad (5)$$

где D_s^{free} – D свободной молекулы «гостя» (субстрата) в водном растворе; D_s^{bound} – D комплекса; D_s^{obs} – D субстрата в растворе CD.

Экспериментально было установлено, что D циклодекстринов при комплексообразовании практически не меняется, то есть справедливо допущение $D_s^{\text{bound}} \sim D_{\text{CD}}$ [38]. Для α - и β -CD величина D составила $0,27 \times 10^{-9}$ м²/с. Другое

допущение касалось величины D_s^{free} . Авторы [38] предположили, что при отсутствии связывания молекулы «гостя» с «хозяином» значения D_s^{free} в водном растворе и растворе, содержащем CD, совпадают, то есть ошибки, вызванные изменением вязкости, незначительны. Расчет ρ показал, что спирты активнее образуют ассоциаты с α -CD, чем с β -CD, при повышении размера молекулы спирта увеличивалась его доля связывания с β -CD. Авторы связали этот факт с гидрофобной природой механизма связывания, а не с размерами полости циклодекстрина.

В дальнейших исследованиях эффективности комплексообразования CD методом DOSY большое внимание уделялось корректировке экспериментально определенных величин D и нивелированию ошибок, связанных с изменением вязкости при переходе от водного раствора к раствору, содержащему CD. Например, в работе [39], посвященной оценке комплексообразования между молекулами α -CD и L-фенилаланина, L-валина и L-лейцина, авторы предложили вводить поправку на вязкость раствора α -CD, которая зависит от его концентрации и вносит свой вклад в величину D «гостя». Поправочный коэффициент рассчитывали как отношение динамической вязкости растворителя $\eta(0)$ к вязкости раствора α -CD определенной концентрации $\eta([CD])$. Для расчета $\eta([CD])$ была предложена следующая эмпирическая функция:

$$\eta([CD]) = \eta(0) + 3,1[CD] + 11,43[CD]^2, \quad (6)$$

где $[CD]$ – концентрация α -CD (моль/л).

В результате данного исследования было установлено, что L-валин, в отличие от L-фенилаланина и L-лейцина, не образует комплекс включения с α -CD ($\rho_{\text{Val}} = 0$). Отсутствие невалентных взаимодействий между L-валином и α -CD подтверждено методом ^1H - ^1H ROESY: в спектре ROESY не наблюдались кросс-пики между сигналами атомов молекулы L-валина и атомов внутренней полости α -CD.

Авторы публикации [40] предложили рассчитывать поправочный коэффициент не на основе значений динамической вязкости растворителя и раствора, а на основе значений D внутреннего стандарта, присутствующего в растворителе и в растворе. Изучив возможность включения гиклата доксицилина в полости нативных и полимеризованных с помощью лимонной кислоты β - и γ -CD, они предложили корректировать измеренную величину D с помощью

поправочного коэффициента. Поправочный коэффициент определяли как отношение величины D остаточной воды, определенной в дейтерированном растворителе $D_{\text{HOD}}(\text{ref})$, к величине D остаточной воды, определенной в растворе с компонентами комплекса $D_{\text{HOD}}(\text{obs})$. Образование комплекса включения подтверждали методом ^1H - ^1H ROESY, фиксируя наличие кросс-пиков между сигналами протонов, образующих полость в CD, и сигналами ароматического фрагмента доксициклина. Методами DOSY и ROESY было доказано, что полости полимерных циклодекстринов, имеющих структуру сшитой сетки, по-прежнему способны связывать молекулы гиклата доксициклина. Аналогичный корректировочный коэффициент ($D_{\text{HOD}}(\text{ref})/D_{\text{HOD}}(\text{obs})$) использовали авторы работы [41]. В ней методом DOSY изучен феномен самосборки трехкомпонентных супрамолекулярных систем на основе α -, β - и γ -CD, разветвленных полиэтиленаминов и растворителя (диметилформамида или пиридина). Было установлено, что молекулы растворителя, образуя водородные связи как с CD, так и с полиэтиленамином, играют роль связующего компонента между ними. Методом ^1H - ^1H ROESY был подтвержден факт образования трехкомпонентных систем.

Большой интерес представляет публикация [42], авторы которой методом DOSY изучали сайты связывания β -амилоидного пептида $\text{A}\beta(1-40)$ с β -CD. Для этого определяли долю β -CD, образующего комплекс включения с фрагментами полипептидной цепи $\text{A}\beta(1-9)$ и $\text{A}\beta(12-28)$, и сравнивали ее с долей β -CD, образующего комплекс включения с нативным $\text{A}\beta(1-40)$. Расчет доли связанного CD проводили аналогично [38]. Корректировку измеренных значений D осуществляли с использованием поправочного коэффициента $D_{\text{HOD}}(\text{ref})/D_{\text{HOD}}(\text{obs})$. В ходе исследования было установлено, что фрагмент боковой цепи $\text{A}\beta(12-28)$, в отличие от N-концевого фрагмента $\text{A}\beta(1-9)$, связывается с β -CD, и аффинность CD к этому фрагменту такая же, как к нативному β -амилоидному пептиду $\text{A}\beta(1-40)$. Другие потенциальные лиганды (α -, γ -CD, никотин, норникотин) не обладали аффинностью к $\text{A}\beta(12-28)$.

Еще одна разновидность супрамолекулярных систем на основе полисахаридов — полиэлектролитные комплексы из нескольких полисахаридов, в ряде случаев после их модификации. Полисахариды представляют собой полиэлектролиты и характеризуются очень высокой водоудерживающей способностью, за счет чего возможно создание их

биodeградируемой лечебной формы в виде гидрогеля. Абсорбционно-десорбционные свойства гидрогелей зависят от плотности образующей полимерной сетки, которая увеличивается при переходе от отдельных полисахаридов к полиэлектролитным комплексам на их основе. Метод DOSY является мощным инструментом для исследования строения таких полиэлектролитных комплексов, так как подвижность полисахаридов, объединенных невалентными взаимодействиями, заметно уменьшается. Авторы работы [43] методом DOSY изучали невалентное взаимодействие гиалуроновой кислоты и продукта модификации хитозана лактиолом путем сравнения величин D изолированных полисахаридов и компонентов смеси. Они наблюдали уменьшение величины D модифицированного хитозана до значения коэффициента самодиффузии гиалуроновой кислоты. На основе этого наблюдения был сделан вывод, что компоненты смеси образуют супрамолекулярную систему.

Полиэлектролитные комплексы также получают комбинацией водорастворимых полисахаридов и суфрактантов. Суфрактант-полиэлектролитные комплексы стабилизируются электростатически и гидрофобными взаимодействиями и могут образовываться, даже если концентрация суфрактанта значительно ниже его критической концентрации мицеллообразования. В публикации [44] методом DOSY изучены невалентные взаимодействия между кватернизованным хитозаном и положительно заряженным 1-декансульфонатом натрия. С помощью измеряемой величины D водных растворов суфрактанта и смеси суфрактанта с кватернизованным хитозаном определены критическая концентрация мицеллообразования 1-декансульфоната натрия и критическая концентрация его агрегации с полисахаридом. Данные, полученные методом DOSY, хорошо согласуются с данными кондуктометрии.

Сравнительно новое направление применения метода DOSY — анализ эффективности связывания супрамолекулярных носителей с лекарственным средством. Например, в работе [45] метод DOSY применили для оценки невалентных взаимодействий между галлатом эпигаллокатехина (EGCG) и полисахаридной наночастицей, содержащей мальтодекстрин (MD) и гуммиарабик (GA). Наночастицу MD/GA получали из MD с ММ 1 кДа и GA с ММ 250 кДа.

EGCG является компонентом зеленого чая и оказывает противовоспалительное, противовирусное, противораковое и противогрибковое

действие. Однако его фармацевтическое применение ограничено плохой растворимостью и неэффективной проникаемостью. Для повышения биодоступности EGCG его связывали с биодеградируемой наночастицей. Авторы [45] сравнивали величины D изолированных EGCG, MD, GA с их значениями D в смесях EGCG + MD + GA и EGCG + MD/GA, а также в продукте взаимодействия лекарства с наночастицей EGCG-MD/GA. Корректировку измеренных значений D проводили, используя поправочный коэффициент $1/D_{TSP}$ (D_{TSP} — величина D триметилсилилпропионата натрия, внутреннего стандарта, добавляемого в раствор для калибровки шкалы химических сдвигов). Экспериментально было установлено, что скорректированные значения D для EGCG, MD и GA в EGCG-MD/GA ниже соответствующих значений в физических смесях EGCG + MD/GA и EGCG + MD + GA, которые воспроизводят состав EGCG-MD/GA. Снижение подвижности EGCG, MD и GA в EGCG-MD/GA является убедительным свидетельством невалентного взаимодействия EGCG с наночастицей.

Приведенные примеры наглядно демонстрируют востребованность метода DOSY для решения задач компонентного анализа сложных смесей и оценки формирования и стабильности супрамолекулярных систем.

Количественное определение средней молекулярной массы полисахаридов методом DOSY

Метод DOSY является косвенным методом определения ММ полимеров. Он требует калибровки, при которой измеряемая величина D градуируется по известным массам однотипных полимеров. Существуют два подхода к количественному определению величины ММ:

- 1) установление общего для широкого круга полисахаридов корреляционного уравнения $D = f(\text{ММ})$ и варьирование параметров импульсной градиентной последовательности (значений Δ и δ) при его использовании для оценки ММ конкретных соединений. Изменение параметров необходимо для учета особенностей топологии макромолекулы испытуемого полисахарида, специфики его невалентных взаимодействий с растворителем и вязкости раствора;
- 2) подбор общих для полисахаридов параметров импульсной градиентной последовательности и вывод индивидуальных корреляционных уравнений для каждого класса полисахаридов.

В рамках первого подхода основополагающей является работа [46], авторы которой предложили единое корреляционное уравнение для всех водорастворимых линейных и слаборазветвленных полисахаридов:

$$D = 8,2 \times 10^{-9} \times \text{ММ}^{-0,49} \text{ м}^2/\text{с}. \quad (7)$$

Это уравнение было выведено на основе измеренных коэффициентов самодиффузии разбавленных водных растворов пуллуланов с известными ММ и затем использовано для оценки величины молекулярных масс других олиго- и полисахаридов (сахарозы, α -, β - и γ -циклодекстранов, декстранов, амилозы и т.д.). Для каждого образца, входящего в контрольную выборку, подбирали такие значения Δ и δ для импульсной градиентной последовательности, чтобы в ходе DOSY эксперимента воспроизводилась величина D внутреннего стандарта (остаточной воды в дейтерированном растворителе). Интервал варьируемых значений Δ , δ и используемая авторами [46] импульсная градиентная последовательность представлены в таблице 1.

Впоследствии многие исследователи использовали корреляционное уравнение (7) при определении ММ различных полисахаридов, выделяемых из природного сырья. Например, в работе [27] уравнение (7) применили для оценки ММ полисахарида, выделенного из лекарственного растения *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng. Характерная особенность данного исследования — в импульсной последовательности варьировали только время диффузии, в то время как значение продолжительности градиентного импульса было постоянным (табл. 1). Авторы работы [47] с помощью уравнения (7) оценивали ММ бактериальных экзополисахаридов, образующихся при промышленной ферментации оливок. Принято считать, что данные полисахариды ответственны за полезные свойства кисломолочных продуктов. В эксперименте DOSY использовали один набор параметров импульсной градиентной последовательности (табл. 1) для изучаемых полисахаридов, причем критерий его выбора в публикации не представлен. Рассчитанные величины ММ легли в основу вывода: экзополисахариды, выделенные из рассола оливок, не совпадают с экзополисахаридами молочнокислых бактерий *Lactobacillus pentosus*.

Авторы работы [48] применили уравнение (7) для оценки ММ арабиногалактанов, входящих в состав экстракта зеленых водорослей *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Аналогично [27]

в эксперименте DOSY варьировали только один параметр, но не значение времени диффузии, а величину продолжительности градиентного импульса (табл. 1). Следует отметить, что для установления строения выделенных арабиногалактанов наряду с методом DOSY был использован целый комплекс методов ЯМР (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H DQF-COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC). Значения ММ арабиногалактанов, полученные с помощью метода DOSY, были подтверждены данными HPSEC.

В работе [49] с помощью уравнения (7) оценена ММ β -1,3-глюкана, выделенного из гриба *Ganoderma lucidum* Karst. Данный полисахарид проявляет свойства эффективного антиоксиданта. Расчетное значение ММ, полученное по уравнению (7) без подбора оптимальных значений параметров импульсной градиентной последовательности, составило 3,98 кДа, в то время как по данным MALDI-TOF MS оно равно 1,5 кДа. Этот пример наглядно иллюстрирует необходимость обязательной оптимизации параметров импульсной градиентной последовательности при использовании универсального уравнения (7) для оценки ММ отдельных полисахаридов.

Авторы работ [50, 51] провели сравнительный анализ результатов измерения ММ высокомолекулярных декстранов методами DOSY, HPSEC и AsFLFFF. Было установлено, что метод DOSY дает более высокие значения ММ. Этот факт был объяснен образованием агрегатов из высокомолекулярных декстранов в растворах, которые не разрушаются при действии на них импульса градиента магнитного поля. При оценке низкомолекулярных декстранов наблюдалось хорошее согласование данных, полученных всеми тремя методами. Дополнительно авторы сравнили значения ММ высокомолекулярных декстранов, полученные с использованием уравнения (7) (подход № 1) и с использованием собственного корреляционного уравнения (подход № 2):

$$D = 5,47 \times 10^{-9} \times \text{ММ}^{-0,425} \text{ м}^2/\text{с}. \quad (8)$$

Уравнение (8) выводили на основе данных, полученных с помощью стандартных образцов декстранов с аттестованными значениями ММ, варьируя величину δ (табл. 1). Существенное различие в параметрах корреляционных уравнений (7) и (8) было объяснено различием в ММ объектов, используемых при построении калибровочных кривых (5,8–853 и 12–11900 кДа при выводе уравнений (7) и (8) соответственно).

Экспериментально установленный факт влияния диапазона ММ макромолекул калибровочной кривой на значения параметров корреляционного уравнения является весомым аргументом в пользу подхода № 2. В литературе представлены многочисленные примеры его реализации. Например, авторы работы [52] выводили собственное корреляционное уравнение для оценки ММ полисахарида F1SS, выделенного щелочной экстракцией из клеточной стенки гриба *Acrosporum compressum* Tode, и продукта его частичного кислотного гидролиза. Калибровочную кривую строили, используя набор коммерчески доступных декстранов с известными значениями ММ. Внутренний стандарт не применяли. Параметры импульсной градиентной последовательности, используемой для получения величин D , приведены в таблице 1.

В публикации [53] было отмечено, что подход № 1 не применим при разработке валидируемой методики количественной оценки ММ методом DOSY. Валидация такой методики возможна только в рамках подхода № 2, так как она требует соблюдения одинаковых условий при количественном определении всех анализируемых образцов. Авторы [53] подобрали универсальные параметры DOSY эксперимента, применимые для широкого круга полисахаридов с различной ММ. Значения Δ и δ импульсной градиентной последовательности, температуру, растворитель и концентрацию полисахаридов выбирали, руководствуясь следующими критериями: воспроизводимость значения D воды в растворах полисахаридов ($20,2 \times 10^{-10} \text{ м}^2\text{с}^{-1}$ [46]); применение импульсной градиентной последовательности с данными параметрами к полисахаридам в широком диапазоне ММ и разрешение по величине D полисахаридов с близкими значениями ММ. С помощью универсальных параметров DOSY эксперимента были выведены корреляционные уравнения для отдельных классов водорастворимых полисахаридов: пуллуланов [54], декстранов [53], гидроксипропилакрахмалов [55] (табл. 2). Значения D полисахаридов, рассчитанные с их помощью, хорошо согласуются с данными высокоэффективной эксклюзионной гелевой проницающей хроматографии. Методика определения ММ декстранов методом DOSY была валидирована [56].

Абсолютное значение показателя степени в степенных функциях возрастает в ряду пуллуланы < декстраны < гидроксипропилакрахмалы (табл. 2). Отсюда следует, что постоянным значениям D незаряженных полисахаридов,

Таблица 1. Параметры импульсных градиентных последовательностей в прецизионных экспериментах DOSY

Table 1. Parameters of gradient pulse sequences in precision DOSY experiments

Параметры DOSY эксперимента <i>DOSY experiment parameters</i>					Источник литературы <i>Reference</i>
Импульсная последовательность <i>Pulse sequence</i>	Δ , мс <i>ms</i>	δ , мс <i>ms</i>	Максимальная амплитуда импульса градиента, Гс/см <i>Maximum gradient amplitude, gf/cm</i>	Градиент магнитного поля, % (число шагов увеличения амплитуды) <i>Gradient strength, % (amplitude magnification steps)</i>	
BPP-LED	400–1000	1,0–2,3	55	2–95 (32)	46
BPP-LED	100–700	3	55	2–95 (32)	27
BPP-LED	800	1,5	нет данных <i>no data available</i>	нет данных <i>no data available</i>	47
BPP-LED	200	7,0–11,9	5,35	5–95 (64)	48
BPPSTE-cc	600	1,0–6,5	64	1–98 (30)	50, 51
LEDBPG2S	400	4	53,55	2–95 (нет данных / <i>no data available</i>)	52
BPPSTE	285	2	55	3–96 (15)	53–55, 59, 60
BPPSTE-cc	285	2	55	3–96 (15)	56

Примечание. BPP-LED – импульсная последовательность стимулированного спинового эха, включающая биполярные градиентные импульсы и продольную задержку вихревого тока [61]; BPPSTE-cc – импульсная последовательность биполярного импульсного парного стимулированного спинового эха с компенсацией конвекции [62]; LEDBPG2S – импульсная последовательность стимулированного спинового эха, включающая биполярные градиентные импульсы с двумя спойлерными градиентами и компенсацию продольных вихревых токов [61]; BPPSTE – импульсная последовательность биполярного импульсного парного стимулированного спинового эха [61].

Note. BPP-LED–bipolar pulse pair stimulated echo sequence with longitudinal eddy current delay [61], BPPSTE-cc–bipolar pulse pair stimulated echo sequence with convection compensation [62], LEDBPG2S–sequence with stimulated echo, longitudinal eddy current compensation, bipolar gradient pulses, and two spoil gradients [61]; BPPSTE–bipolar pulse pair stimulated echo sequence [61].

Таблица 2. Корреляционные уравнения $MM = f(D)$ для незаряженных полисахаридов с различной степенью ветвления [55, 57]

Table 2. Correlation equations ($MM = f(D)$) for uncharged polysaccharides with different branching degrees [55, 57]

Корреляционное уравнение (MM, кДа; D , 10^{-10} м ² /с) <i>Correlation equation (MM, kDa; $D \times 10^{-10}$ m²/s)</i>		Область применения <i>Application area</i>
степенная зависимость <i>exponentiation</i>	линейная зависимость <i>linear function</i>	
$MM = 9,4862 D^{-1,801}$ ($R^2 = 0,9979$)	$\lg MM = -1,8008 \lg D - 17,03$	Линейные пуллуланы <i>Linear pullulans</i>
$MM = 8,3038 D^{-2,164}$ ($R^2 = 0,9991$)	$\lg MM = -2,1637 \lg D - 20,718$	Малоразветвленные декстраны <i>Low-branched dextrans</i>
$MM = 9,0314 D^{-2,538}$ ($R^2 = 0,9899$)	$\lg MM = -2,5375 \lg D - 24,419$	Разветвленные гидроксипропилахмалы <i>Branched hydroxyethyl starches</i>

характеризующихся одинаковым типом не-валентных взаимодействий и различной степенью ветвления, соответствуют различные молекулярные массы, причем значения MM убывают в ряду гидроксипропилахмалы > декстраны > пуллуланы. Этот вывод хорошо согласуется с известным фактом: разветвленные полимеры характеризуются меньшими размерами молекул, чем линейные². Следует отметить,

что для низкомолекулярных полисахаридов (MM не более 50 кДа) степень ветвления существенно влияет на величину D . С увеличением MM полисахаридов это влияние значительно усиливается (рис. 2).

Величина D характеризует подвижность макромолекулы полисахарида как единого целого. В действительности растворы полимеров,

² Пасынский АГ. Коллоидная химия. М.: Высшая школа; 1959.

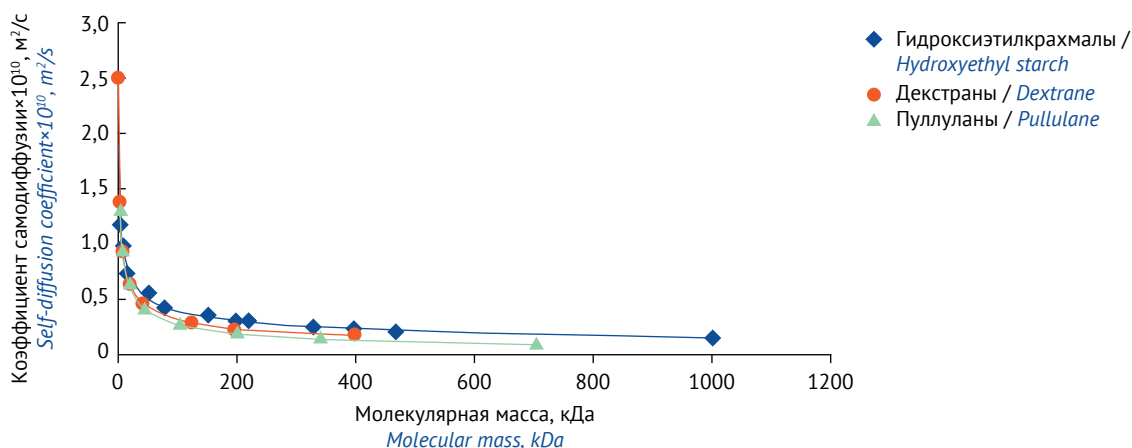


Рис. 2. Зависимости коэффициента самодиффузии от молекулярной массы для гидроксиэтилкрахмалов, декстранов и пуллуланов

Fig. 2. Dependencies self-diffusion coefficient from the molecular weight for hydroxyethyl starches, dextrans, and pullulans

как правило, характеризуются несколькими значениями D даже в том случае, если образец представляет собой набор близких по длине и массе макромолекул, то есть является узкодисперсным (см., например, рис. 3).

Одна из причин данного явления — наличие в исследуемой системе ряда состояний, соответствующих минимумам на поверхности потенциальной энергии (например, различных конформаций или ассоциатов с растворителем), и химический обмен между ними (переход спина или группы спинов между несколькими состояниями). В случае медленного химического обмена каждый набор сигналов, соответствующий различным состояниям, будет характеризоваться своим значением D . Другая причина экспериментально наблюдаемого разброса значений D ядер макромолекулы полимера — различная локальная подвижность сегментов полимерной цепи, которая не зависит от молекулярной массы полимера, но является специфической для каждой конкретной системы «полимер–растворитель» и зависит от температуры измерения. В рамках метода ЯМР системы спинов ядер, характеризующихся единственными значениями исследуемого параметра (D , времени релаксации T_1 или T_2 и т.д.), принято выделять в фазы [58]. Определяемые таким образом фазы не имеют ничего общего с термодинамическими фазами состояния вещества. Следовательно, растворы полимеров, которые характеризуются набором значений D , являются полифазными системами. Проблему характеристики трансляционной подвижности полифазной полимерной макромолекулы как единого целого решают различными способами. Например, за величину D макромолекулы полисахарида принимают величины D

аномерных протонов [45] или протонов, участвующих в межмолекулярных невалентных взаимодействиях [40]. В работах [53–55] предложено использовать величину D в максимальном пике на диаграмме распределения D в образце полимера (D_p). Авторы [58] предложили характеризовать подвижность полифазной полимерной макромолекулы средним коэффициентом самодиффузии (D_s), который определяют по формуле:

$$D_s = \sum p_i \times D_i, \quad (9)$$

где p_i — относительная доля (населенность) резонирующих ядер в образце, характеризующихся значением D_i .

В работах [59–60] предложено определять величины p_i путем интегрирования пиков на диаграмме распределения D . Например, на рисунке 4 представлена диаграмма распределения D образца гидроксиэтилкрахмала с ММ 459 кДа,

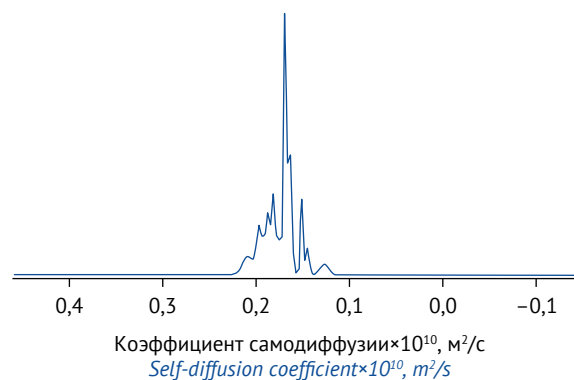


Рис. 3. Распределение величин коэффициента самодиффузии образца декстрана с молекулярной массой 670 кДа

Fig. 3. Diagram of the distribution of D values of the dextran sample with a molecular mass of 670 kDa

величина D_s которого ($0,272 \times 10^{-10}$ м²/с) получена усреднением восьми значений D_i .

Часто полисахариды обладают полидисперсностью. Полидисперсный полимер представляет собой набор макромолекул различной длины и разной массы, который описывают молекулярно-массовым распределением. В зависимости от способа усреднения различают средневесовую молекулярную массу (M_w , получают усреднением по массе макромолекул в полимере) и среднечисловую молекулярную массу (M_n , получают усреднением по числу макромолекул в полимере). Величина M_w чувствительна к высокомолекулярным фракциям, а M_n — к низкомолекулярным фракциям полидисперсных полимеров. Поэтому для характеристики средней ММ полимеров часто используют молекулярную массу в максимуме хроматографического пика (M_p), которая для узкодисперсных образцов равна $M_p = (M_w \times M_n) \times 0,5$ [63]. Отношение M_w/M_n определяет индекс полидисперсности полимера, позволяющий оценить разброс макромолекул по молекулярным массам. Кроме того, с помощью индекса полидисперсности можно определить число единиц ветвления в разветвленной макромолекуле полимера [63]. Существует несколько способов характеризовать полидисперсность образца в рамках метода DOSY. Например, авторы работы [48] предложили характеризовать полидисперсность распределением величин D (distribution of self-diffusion coefficients, DSDC) и использовать в качестве количественных характеристик центр DSDC (как средневесовой D) и полуширину DSDC (как стандартное отклонение DSDC).

Авторы [59, 60] исследовали степенные зависимости параметров молекулярно-массового распределения декстранов и гидроксиэтил-

крахмалов (M_w , M_n и M_p) от диффузионных характеристик (D_p и D_s). Погрешности расчетов оценивали относительно экспериментальных значений параметров молекулярно-массового распределения, определенных методом HPSEC. В целом наблюдалось хорошее соответствие между параметрами молекулярно-массового распределения, определявшимися HPSEC и рассчитанными с использованием выведенных в рамках метода DOSY регрессионных уравнений. Для декстранов был сделан вывод, что наиболее точно диффузионные параметры коррелируют с ММ в максимуме хроматографического пика (M_p). Для гидроксиэтилкрахмалов независимо от способа характеристики значения D (с помощью D_s или D_p) соответствие расчетных параметров молекулярно-массового распределения экспериментальным значениям HPSEC увеличивалось в ряду $M_n \approx M_p < M_w$. Погрешность определения M_w гидроксиэтилкрахмалов методом DOSY практически не превышала погрешности определения ММ методом HPSEC (5–10%). При этом значения индексов полидисперсности, определенные методом DOSY, не зависят от выбора диффузионного параметра D_s или D_p .

Следует подчеркнуть, что у модифицированных природных полисахаридов ММ макромолекул зависит не только от протяженности полимерной цепи, но и от степени модификации. Например, ММ макромолекул гидроксиэтилкрахмалов зависит от двух факторов: числа мономерных звеньев в полимерной цепи (n) и степени молярного замещения гидроксильных групп гидроксиэтильными фрагментами. Следовательно, возможно существование гидроксиэтилкрахмалов с одинаковой ММ, но различной комбинацией числа мономерных звеньев и молярного замещения (укороченная полимерная цепь с высокой степенью замещения либо протяженная полимерная цепь, характеризующаяся низким значением молярного замещения). Комбинация « n —молярное замещение» влияет на размер макромолекул гидроксиэтилкрахмалов и, как следствие, на их подвижность. Установлено, что с увеличением степени модификации крахмала увеличивается коэффициент самодиффузии гидроксиэтилкрахмалов, то есть при близких значениях ММ размер макромолекулы гидроксиэтилкрахмала с укороченной, но высокозамещенной полимерной цепью будет превышать размер макромолекулы с большей протяженностью полимерной цепи, но меньшим значением молярного замещения [64]. Таким образом,

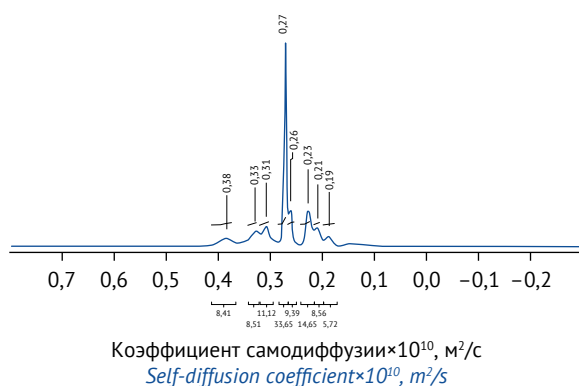


Рис. 4. Распределение коэффициентов самодиффузии образца гидроксиэтилкрахмала с молекулярной массой 459 кДа

Fig. 4. Diagram of the distribution of self-diffusion coefficients of the hydroxyethyl starch sample with a molecular mass of 459 kDa

молярное замещение оказывает обратный эффект на подвижность макромолекул гидроксиэтилкрахмалов по сравнению с ветвлением полимерной цепи. Неоднородность гидроксиэтилкрахмалов по величине молярного замещения является причиной увеличения погрешности расчета ММс помощью уравнения парной степенной регрессии ММ от D . Для повышения точности оценки ММ гидроксиэтилкрахмалов методом DOSY авторы [64] предложили использовать метод множественной регрессии и включить в построение линейной модели логарифмическое значение молярного замещения:

$$\lg M_w = -0,6826 \lg M_3 - 2,9079 \lg D_s - 28,236, \quad (10)$$

где M_w — средневесовая молекулярная масса гидроксиэтилкрахмалов (кДа), M_3 — степень молярного замещения, D_s — средний коэффициент самодиффузии ($\text{м}^2/\text{с}$).

Значение молярного замещения определяют по методике [65, 66], используя данные ^1H спектра.

Таким образом, прецизионная оценка величины ММ полисахаридов представляет собой нетривиальную задачу, даже если все инструментальные источники погрешностей учтены и значения D скорректированы. Основная трудность точного определения значения коэффициента самодиффузии полисахарида связана с полидисперсностью анализируемого образца и полифазностью его макромолекул.

Заключение

В представленном обзоре обобщены основные направления использования метода DOSY для анализа природных и модифицированных природных полисахаридов, применяемых в фармацевтике и фармацевтической биотехнологии. Показано, что данный метод наиболее

востребован в случаях, если не требуется прецизионное измерение величины коэффициента самодиффузии. В этом случае практически не возникает проблем корректной интерпретации экспериментальных данных. Метод DOSY активно применяют для экспрессного компонентного анализа сложных смесей природного происхождения, не прибегая при этом к физическому разделению полисахаридов, и для оценки чистоты изолированных природных и модифицированных природных полисахаридов. Этот метод также расширил возможности исследования образования супрамолекулярных систем на основе полисахаридов — наиболее перспективного направления при разработке инновационных продуктов медицинского применения. Оценка диффузионных параметров с сохранением традиционной спектральной информации (значения химических сдвигов, мультиплетность сигналов) дает уникальную возможность не только судить об образовании супрамолекулярных систем и их стабильности, но и определять характер межмолекулярных взаимодействий и выявлять сайты связывания между компонентами супрамолекулярной системы и между лекарственным средством и супрамолекулярным носителем.

В количественном анализе метод DOSY применяют для точной оценки параметров молекулярно-массового распределения полисахаридов. В обзоре обобщены способы интерпретации экспериментальных данных, повышающие достоверность измеренных значений коэффициентов самодиффузии. Сделан вывод, что валидация методик количественного определения молекулярных масс различных классов полисахаридов этим методом возможна только при унификации условий проведения DOSY-эксперимента (постоянные температура, растворитель, концентрации растворов, импульсная градиентная последовательность, время диффузии и длительность градиентного импульса).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yanaki T, Ito W, Tabata K, Kojima T, Norisuye T, Takano N, Fujita H. Correlation between the anti-tumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophys Chem.* 1983;17(4):337–42. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(83\)80018-0](https://doi.org/10.1016/0301-4622(83)80018-0)
2. Sasaki T, Takasuka N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydr Res.* 1976;47(1):99–104. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)83552-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)83552-1)
3. Sasaki T, Abiko N, Sugino Y, Nitta K. Dependence on chain length of antitumor activity of (1→3)-β-D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, IFO 13140, and its acid-degraded products. *Cancer Res.* 1978;38(2):379–83. PMID: 620409
4. Зуева ЕП, Лопатина КА, Разина ТГ, Гурьев АМ. *Полисахариды в онкологии*. Томск: Печатная мануфактура; 2010. [Zueva EP, Lopatina KA, Razina TG, Guriev AM. *Polysaccharides in oncology*. Tomsk: Pechatnaya manufaktura; 2010 (In Russ.)]

5. Медуницын НВ. *Вакцинология*. М.: Триада-Х; 2004. [Medunitsyn NV. *Vaccinology*. Moscow: Triada-X; 2004 (In Russ.)]
6. Большаков ИН, Еремеев АВ, Черданцев ДВ, Каскаев АВ, Кириченко АК, Власов АА, Сапожников АН. Биодegradируемые раневые покрытия на основе полисахаридных полимеров в лечении обширной ожоговой травмы (клиническое исследование). *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии*. 2011;3:56–62. [Bolshakov IN, Eremeev AV, Cherdantsev DV, Kaskaev AV, Kirichenko AK, Vlasov AA, Sapozhnikov AN. The biodegradable wound coverings on the basis of polysaccharide polymers in the treatment of extensive burn damage (clinical research). *Voprosy rekonstruktivnoy i plasticheskoy khirurgii = Issues of Reconstructive and Plastic Surgery*. 2011;3:56–62 (In Russ.)]
7. Хлыстова ТС, Колаева АВ, Валуева МИ, Гусев ИВ. Природные полимеры для создания раневых покрытий. *Сырье и упаковка*. 2014;153(1):30–1. [Khlystova TS, Kolaeva AV, Valueva MI, Gusev IV. Natural polymers for creating wound coverings. *Syr'ye i upakovka = Raw Materials and Packaging*. 2014;153(1):30–1 (In Russ.)]
8. Молчанов ИВ, Гольдина ОА, Горбачевский ЮВ. *Растворы гидроксэтилированного крахмала – современные и эффективные плазмозамещающие средства инфузионной терапии*. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 1998. [Molchanov IV, Goldina OA, Gorbachevsky YuV. *Hydroxyethylated starch solutions – modern and effective plasma-substituting agents for infusion therapy*. Moscow: NTSSSKh im. A.N. Bakuleva RAMN; 1998 (In Russ.)]
9. Shu CH, Wen BJ, Lin KJ. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7. *Biotechnol Lett*. 2004;26(4):2061–4. PMID: 15055776
10. Беседнова НН, Кузнецова ТА, Запорожец ТС, Крыжановский СП, Гажа АК, Добряков ЕЮ, Звягинцева ТН. Воздействие полисахаридов из морских водорослей на патогенетические мишени *Helicobacter pylori* – новое направление в терапии и профилактике хеликобактерной инфекции. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020;65(1–2):44–53. [Besednova NN, Kuznetsova TA, Zaporozhets TS, Kryzhanovsky SP, Gazha AK, Dobryakov EYu, Zvyagintseva TN. The influence of polysaccharides from sea algae on the pathogenetic targets of *Helicobacter pylori* – a new direction in therapy and prevention of infection. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2020;65(1–2):44–53 (In Russ.)] <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-1-2-44-53>
11. Олтаржевская НД, Коровина МА, Кричевский ГЕ, Щедрина МА, Егорова ЕА. Возможности применения полисахаридов при лечении ран. *Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка*. 2019;6(2):24–31. [Oltarzhevskaya ND, Korovina MA, Krichevsky GE, Shchedrina MA, Egorova EA. The opportunities of using polysaccharides for the wound treatment. *Rany i ranevye infektsii. Zhurnal im. prof. B.M. Kostyuchenka = Wounds and Wound Infections. The prof. B.M. Kostyuchenko Journal*. 2019;6(2):24–31 (In Russ.)] <https://doi.org/10.25199/2408-9613-2019-6-2-24-31>
12. Kojima T, Tabata K, Itoh W, Yanaki T. Molecular weight dependence of the antitumor activity of schizophyllan. *Agric Biol Chem*. 1986;50(1):231–2. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867365>
13. Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Paulsen BS, Wagner H. Immunologically active O6-branched (1 \rightarrow 3)- β -glucan from the lichen *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*. 2003;10(4):318–24. <https://doi.org/10.1078/094471103322004811>
14. Maeda YY, Chihara G. Lentinan and other antitumoral polysaccharides. In: Wagner H, ed. *Immunomodulatory agents from plants*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1999. P. 203–21. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8763-2_8
15. Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):523–33. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.523-533.2000>
16. Cozzolino R, Malvagna P, Spina E, Giori A, Fuzzati N, Anelli A, et al. Structural analysis of the polysaccharides from *Echinacea angustifolia* radix. *Carbohydr Polym*. 2006;65(3):263–72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.012>
17. Morris KF, Johnson Jr CS. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 1992;114(8):3139–41. <https://doi.org/10.1021/ja00034a071>
18. Price WS. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory. *Concept Magn Reson*. 1997;9(5):299–336. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1997\)9:5%3C299::AID-CMR2%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1997)9:5%3C299::AID-CMR2%3E3.0.CO;2-U)
19. Johnson Jr CS. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 1999;34(3–4):203–56.
20. Schulze BM, Watkins DL, Zhang J, Ghiviriga I, Castellano RK. Estimating the shape and size of supramolecular assemblies by variable temperature diffusion ordered spectroscopy. *Org Biomol Chem*. 2014;12(40):7932–6. <https://doi.org/10.1039/c4ob01373e>
21. Flory P. *Principles of Polymer Chemistry*. New York: Cornell University Press; 1978.
22. Gounarides JS, Chen A, Shapiro MJ. Nuclear magnetic resonance chromatography: applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interactions. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;725(1):79–90. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(98\)00512-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00512-x)
23. Steiskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: spin echoes in presence of a time-dependent field gradient. *J Chem Phys*. 1965;42(1):288. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>
24. Харламов СВ, Латыпов ШК. Современная диффузионно-упорядоченная спектроскопия ЯМР в химии супрамолекулярных систем: возможности и ограничения. *Успехи химии*. 2010;79(8):699–719. [Kharlamov SV, Latypov ShK. Modern diffusion-ordered NMR spectroscopy in chemistry of supramolecular systems: the scope and limitations. *Uspekhi khimii = Advances in Chemistry*. 2010;79(8):699–719 (In Russ.)] <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n08ABEH004148>

25. Черныш ЮЕ, Волынкин ВА, Панюшкин ВТ, Кондаков ВИ, Коробов МС, Бородин ГС. Применение селективных методов гетероядерной спектроскопии ЯМР в исследованиях многокомпонентных систем. *Успехи химии*. 2005;74(4):344–68. [Chernysh YuE, Volynkin VA, Panyushkin VT, Kondakov VI, Korobov MS, Borodkin GS. The use of selective methods of heteronuclear NMR spectroscopy in studies of multicomponent systems. *Uspekhi khimii* = *Advances in Chemistry*. 2005;74(4):344–68 (In Russ.)] <https://doi.org/10.1070/RC2005v074n04ABEH000892>
26. Li D, Kagan G, Hopson R, Williard PG. Formula weight prediction by internal reference diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY). *J Am Chem Soc*. 2009;131(15):5627–34. <https://doi.org/10.1021/ja810154u>
27. Hsieh YSY, Chien C, Liao SKS, Liao SF, Hung WT, Yang WB, et al. Structure and bioactivity of the polysaccharides in medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(11):6054–68. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.042>
28. Pannakal ST, Jäger S, Duranton A, Tewari A, Saha S, Radhakrishnan A, et al. Longevity effect of a polysaccharide from *Chlorophytum borivilianum* on *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2017;12(7):e0179813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179813>
29. Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. *J Nat Prod*. 2004;67(2):300–10. <https://doi.org/10.1021/np030372w>
30. Tomati U, Belardinelli M, Galli E, Iori V, Capitani D, Mannina L, et al. NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill waste waters. *Carbohydr Res*. 2004;339(6):1129–34. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.007>
31. Breitenbach R, Silbernagl D, Toepel J, Sturm H, Broughton WJ, Sasaki GL, Gorbushina AA. Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles*. 2018;22:165–75. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0984-5>
32. Politi M, Groves P, Chavez MI, Canada FJ, Jimenez-Barbero J. Useful applications of DOSY experiments for the study of mushroom polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 2006;341(1):84–9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.008>
33. Ortner K, Sivanandam VN, Buchberger W, Müller N. Analysis of glycans in glycoproteins by diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(1):173–7. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1232-0>
34. Yamanai T, Oda Y, Katsuraya K. Separation of the α - and β -anomers of carbohydrates by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Magnetochemistry*. 2017;3(4):38. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry3040038>
35. Szejtli J. *Cyclodextrin Technology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1988. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-7797-7>
36. Szejtli J, Osa T. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. 3. *Cyclodextrins*. Oxford: Pergamon; 1996.
37. Frömming KH, Szejtli J. *Cyclodextrins in Pharmacy*. Dordrecht: Kluwer Academic; 1994. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-8277-3>
38. Ryndén R, Carlfors J, Stilbs P. Substrate binding to cyclodextrins in aqueous solution. A multicomponent self-diffusion study. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 1983;(1):159–67. <https://doi.org/10.1007/BF00656818>
39. Wimmer R, Aachmann FL, Larsen KL, Petersen SB. NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. *Carbohydr Res*. 2002;337(9):841–9. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00066-6)
40. Bakkour Y, Vermeersch G, Morcellet M, Boschin F, Martel B, Azaroual N. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with doxycycline-hyclate: NMR investigation of their characterisation and stability. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2006;54(1):109–14. <https://doi.org/10.1007/s10847-005-5108-7>
41. Kasprzak A, Poplawska M, Krawczyk H, Molchanov S, Kozłowski M, Bystrzejewski M. Novel non-covalent stable supramolecular ternary system comprising of cyclodextrin and branched polyethylenimine. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2017;87(1):53–65. <https://doi.org/10.1007/s10847-016-0677-1>
42. Danielsson J, Jarvet J, Damberg P, Gräslund A. Two-site binding of beta-cyclodextrin to the Alzheimer A β (1–40) peptide measured with combined PFG-NMR diffusion and induced chemical shifts. *Biochemistry*. 2004;43(20):6261–9. <https://doi.org/10.1021/bi036254p>
43. Ladiè R, Cosentino C., Tagliaro I, et al. Supramolecular structuring of hyaluronan-lactose-modified chitosan matrix: towards high-performance biopolymers with excellent biodegradation. *Biomolecules*. 2021;11(3):389. <https://doi.org/10.3390/biom11030389>
44. Senra TD, Khouk A, Desbrières J. Interactions between quaternized chitosan and surfactant studied by diffusion NMR and conductivity. *Carbohydr Polym*. 2017;156:182–92. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.025>
45. Peres I, Rocha S, Pereira MC, Coelho M, Rangel M, Ivanova G. NMR structural analysis of epigallocatechin gallate loaded polysaccharide Nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2010;82(3):861–6. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.007>
46. Viel S, Capitani D, Mannina L, Segre A. Diffusion-ordered NMR spectroscopy: a versatile tool for the molecular weight determination of uncharged polysaccharides. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1843–7. <https://doi.org/10.1021/bm0342638>
47. Zhu Y, González-Ortiz G, Jiménez-Díaz R, Pérez-Trujillo M, Parella T, López-Colom P, et al. Exopolysaccharides from olive brines could reduce the adhesion of ETEC K88 to intestinal epithelial cells. *Food Funct*. 2018;7(7):3884–94. <https://doi.org/10.1039/C8FO00690C>
48. Suárez ER, Syvitski R, Kralovec JA, Nosedá MD, Barrow CJ, Ewart HS, et al. Immunostimulatory Polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuranan. measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY NMR. *Biomacromolecules*. 2006;7(8):2368–76. <https://doi.org/10.1021/bm060365x>
49. Kao PF, Wang SH, Hung WT, Liao YH, Lin CM, Yang WB. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:673764. <https://doi.org/10.1155/2012/673764>
50. Maina NH, Pitkänen L, Heikkinen S, Tuomainen P, Virkki L, Tenkanen M. Challenges in analysis of high-molar mass

- dextrans: Comparison of HPSEC, AsFFFF and DOSY NMR spectroscopy. *Carbohydr Polym.* 2014;99:199–207. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.021>
51. Maina N.H. *Structure and macromolecular properties of Weissella confusa and Leuconostoc citreum dextrans with a potential application in sourdough*. Ph.D. Dis. Helsinki: University of Helsinki; 2012.
 52. Prieto A, Leal JA, Giménez-Abián MI, Canales A, Jiménez-Barbero J, Bernabé M. Isolation and structural determination of a unique polysaccharide containing mannofuranose from the cell wall of the fungus *Acrosporum compressum*. *Glycoconj J.* 2007;24(8):421–8. <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9032-5>
 53. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Количественное определение средней молекулярной массы декстранов методом диффузионно упорядоченной спектроскопии ЯМР. *Журнал аналитической химии.* 2014;69(10):1047–53. [[Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Quantitative determination of the average molecular weights of dextrans by diffusion ordered NMR spectroscopy. *J Anal Chem.* 2014;69(10):953–9] <https://doi.org/10.1134/S1061934814100086>
 54. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Возможности применения метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для количественной оценки средней молекулярной массы пуллуланов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2013;(4):8–11. [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. The possibility of using diffusion-ordered NMR spectroscopy for quantitative analysis of pullulan average molecular weight. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2013;(4):8–11 (In Russ.)]
 55. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Определение средней молекулярной массы гидроксиэтилкрахмалов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. *Журнал аналитической химии.* 2015;70(1):30–6. [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Determination of the average molecular weight of hydroxyethyl starches by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *J Anal Chem.* 2015;70(1):32–8] <https://doi.org/10.1134/S1061934815010086>
 56. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения средней молекулярной массы декстранов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал.* 2017;51(9):60–3. [Moiseev SV, Kuzmina NE, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of a method of measuring mean molecular weight of dextrans by diffusion-ordered spectroscopy. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2017;51(9):829–32] <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1701-5>
 57. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Лутцева АИ. Разработка методик определения средневесовой молекулярной массы полисахаридов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. В кн.: *Актуальные проблемы биологической и химической экологии: материалы VII международной научно-практической конференции.* Москва: ИИУ МГОУ; 2021. С. 336–41. [Moiseev SV, Kuzmina NE, Luttseva AI. Development of the technique for determining the weight average molecular weight of polysaccharides by diffusion-ordered NMR spectroscopy. In: *Actual problems of biological and chemical ecology: materials of the VII international scientific and practical conference.* Moscow: Information and publishing department of Moscow State Regional University; 2021. P. 336–41 (In Russ.)]
 58. Маклаков АИ, Скирда ВД, Фаткуллин НФ. *Самодиффузия в растворах и расплавах.* Казань: Изд. Казанского государственного университета; 1987. [Maklakov AI, Skirda VD, Fatkullin NF. Self-diffusion in solutions and melts. Kazan: Kazan State University; 1987 (In Russ.)]
 59. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Определение параметров молекулярно-массового распределения декстранов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2014;(2):9–15. [Moiseev SV, Kuzmina NE, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. The determination of molecular weight distribution parameters of dextrans with the diffusion-ordered NMR spectroscopy technique. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2014;(2):9–15 (In Russ.)]
 60. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Определение параметров молекулярно-массового распределения гидроксиэтилкрахмалов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР. *Журнал аналитической химии,* 2015;70(7):727–33. [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Determination of the parameters of molecular-weight distribution of hydroxyethyl starches by diffusion-ordered NMR spectroscopy. *J Anal Chem.* 2015;70(7):843–9] <https://doi.org/10.1134/S1061934815070060>
 61. Wu DH, Chen AD, Johnson CS. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *J Magn Reson.* 1995;115(2):260–4. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1176>
 62. Jerschow A, Müller N. Suppression of convection artifacts in stimulated echo diffusion experiments. Double-stimulated-echo experiments. *J Magn Reson.* 1997;125(2):372–5 <https://doi.org/10.1006/jmre.1997.1123>
 63. Нефедов ПП, Лавренко ПН. *Транспортные методы в аналитической химии полимеров.* Л.: Химия; 1979. [Nefedov PP, Lavrenko PN. *Transport methods in the analytical chemistry of polymers.* Leningrad: Khimiya; 1979 (In Russ.)]
 64. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Влияние молярного замещения на подвижность макромолекул гидроксиэтилкрахмалов в растворе. *Химико-фармацевтический журнал.* 2016;50(1):53–6. [Moiseev SV, Kuzmina NE, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Effects of molar substitution on the mobility of hydroxyethylstarch macromolecules in solution. *Phar-*

- maceutical Chemistry Journal*. 2016;50(1):58–61] <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1399-9>
65. Кузьмина Н.Е., Моисеев С.В., Крылов В.И., Князькина О.В., Яшкир В.А., Меркулов В.А. Модификация методики определения молярного замещения гидроксизтилкрахмалов методом ^1H ЯМР-спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(8):44–8. [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Knyaz'kina OV, Yashkir VA, Merkulov VA. Modification of PMR spectroscopy technique for determination of the molar substitution in hydroxyethyl starch. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(8):559–63] <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1327-4>
66. Прокофьев Е.П., Юрин О.А. Определение степени замещения и молярного замещения в оксигенированных крахмалах методом ЯМР ^1H . *Химико-фармацевтический журнал*. 1990;24(7):82–4. [Prokofiev EP, Yurin OA. Determination of the degree of substitution and molar substitution in ethoxylated starches by ^1H NMR. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1990;24(7):82–4 (In Russ.)]

Вклад авторов. Н.Е. Кузьмина — идея, планирование исследования, подбор и анализ литературы, подготовка и оформление рукописи; С.В. Моисеев — идея, подбор и анализ литературы, редактирование текста; Е.Ю. Северинова — подбор литературы, оформление рукописи; А.И. Лутцева — ответственность за все аспекты работы, включая надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400083-1).

Конфликт интересов. Н.Е. Кузьмина является членом редколлегии журнала «Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Natalia E. Kuz'mina—initiator of the study idea, planning of the study, literature review, drafting and formatting of the paper; Sergey V. Moiseev—elaboration of the study idea, literature review, editing of the text; Elena Yu. Severinova—literature selection, formatting of the paper; Anna I. Luttseva—responsible for all aspects of the study, including data reliability and integrity of all parts of the paper, approval of the final version of the paper.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400083-1).

Conflict of interest. Natalia E. Kuz'mina is a member of the Editorial Board of *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory research and medicine evaluation*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Моисеев Сергей Владимирович, канд. хим. наук, доц.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Северинова Елена Юрьевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5695-8048>
Severinova@expmed.ru

Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8752-5245>
Lutceva@expmed.ru

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Sergey V. Moiseev, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Elena Yu. Severinova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5695-8048>
Severinova@expmed.ru

Anna I. Luttseva, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8752-5245>
Lutceva@expmed.ru

Статья поступила 15.11.2021

После доработки 10.01.2022

Принята к печати 04.03.2022

Article was received 15 November 2021

Revised 10 January 2022

Accepted for publication 4 March 2022