



Е.А. Смирягин 
О.Г. Корнилова 
В.Л. Багирова 

Определение содержания примеси гистамина в биологических лекарственных средствах: перспективы перехода от методов *in vivo* к методам *in vitro*

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

✉ Смирягин Егор Антонович; smiryaginea@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Наличие в лекарственных средствах (ЛС) примесей, снижающих артериальное давление, может привести к возникновению нежелательных побочных реакций у пациентов. К таким примесям относят гистамин и другие депрессорные вещества. Методика количественного определения примеси гистамина, представленная в действующей общей фармакопейной статье «Испытание на гистамин» Государственной фармакопеи Российской Федерации, основана на взаимодействии гистамина с H1-рецепторами кишечника морской свинки. Однако внедрение концепции 3R (Замена, Сокращение, Усовершенствование; Replacement, Reduction, Refinement) в качестве международного стандарта и отказ ведущих фармакопей от проведения *in vivo* испытаний на содержание примеси гистамина создает необходимость разработки *in vitro* методов количественного определения данного вещества.

ЦЕЛЬ. Выбор перспективного *in vitro* метода количественного определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проведен анализ стратегии Европейской фармакопеи, направленной на отказ от биологических испытаний на содержание примеси гистамина в ЛС. На основании анализа научной литературы установлены наиболее часто используемые физико-химические и иммунохимические методы количественного определения примеси гистамина. Систематизированы условия методик с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Показана возможность проведения непрямого конкурентного гетерофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественной оценки гистамина в биологических лекарственных средствах. Обоснованы критерии выбора между ВЭЖХ и ИФА, основанные на специфике матрицы исследуемой субстанции.

ВЫВОДЫ. В целях количественного определения примеси гистамина в биологических лекарственных средствах могут быть использованы методы ВЭЖХ и ИФА. Методики *in vitro* разрабатывают исходя из состава, строения и свойств матрицы исследуемой субстанции; для структурно гетерогенных матриц, например, для гепаринов, рекомендуется ВЭЖХ, для субстанций пептидной и белковой природы, например, для аprotинина, — ИФА.

Ключевые слова: гистамин; примесь; количественное определение; биологические испытания; *in vitro* методики; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; иммуноферментный анализ; ИФА; концепция 3R

Для цитирования: Смирягин Е.А., Корнилова О.Г., Багирова В.Л. Определение содержания примеси гистамина в биологических лекарственных средствах: перспективы перехода от методов *in vivo* к методам *in vitro*. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):595–603. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-595-603>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Egor A. Smiryagin 
Olga G. Kornilova 
Valeria L. Bagirova 

Identifying Histamine Impurity in Biological Products: Prospective Transition from *in vivo* to *in vitro* Methods

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

✉ Egor A. Smiryagin; smiryaginea@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Drug impurities lowering blood pressure can cause side effects in patients. These impurities include histamine and other depressor substances. The current General pharmacopoeial monograph "Test for Histamine" of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation presents a quantification method of histamine impurity based on histamine interaction with H1 receptors of the guinea pig intestine. However, 3R concept (Replacement, Reduction, Refinement) introduced as an international standard and decision of leading pharmacopoeias to exclude *in vivo* histamine tests makes it necessary to develop *in vitro* methods for quantification of histamine impurity.

AIM. This study aimed to select an advanced *in vitro* method for quantification of histamine impurity as an alternative to *in vivo* tests.

DISCUSSION. Strategy of European Pharmacopoeia aimed at abandoning biological tests for histamine drug impurities was analysed. Scientific literature has shown the most common physicochemical and immunochemical methods for quantification of histamine impurity. The authors systematised test methods using high-performance liquid chromatography (HPLC). Indirect competitive heterogenous enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was shown feasible for histamine quantification in the biological drugs. Choice between HPLC and ELISA was based the matrix of a test substance.

CONCLUSIONS. HPLC and ELISA are promising quantification methods of histamine impurity in biological products. *In vitro* methods are developed according to the composition, structure, and matrix properties of a test substance. Heterogeneous matrices, such as heparins, profit from HPLC, while ELISA is recommended for peptides and proteins, for example aprotinin.

Keywords: histamine; impurity; quantification; biological tests; *in vitro* methods; high-performance liquid chromatography; HPLC; enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; 3R concept

For citation: Smiryagin E.A., Kornilova O.G., Bagirova V.L. Identifying histamine impurity in biological products: prospective transition from *in vivo* to *in vitro* methods. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):595–603. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-5-595-603>

Funding. The study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-01 (R&D Registry No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

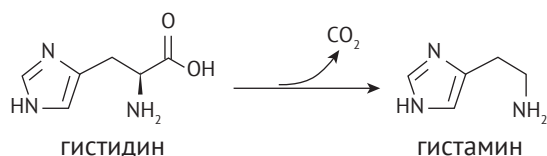
Депрессорные (гистаминоподобные) вещества – общее название широкого спектра соединений, вызывающих при внутрисосудистом введении понижение артериального давления. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)¹ испытание на депрессорные вещества проводят для гепарина натрия, эноксапарина натрия, даунорубицина гидрохлорида, доксорубицина гидрохлорида, митомicina и канамицина сульфата кислого [1].

К депрессорным веществам, которые могут присутствовать в лекарственных средствах (ЛС), в том числе относят гистамин. Гистамин (2-(4-имидазолил)этиламин) – биогенный амин, участвующий в местных иммунных реакциях, а также в регуляции физиологического функционирования кишечника и действующий как нейромедиатор [2]. Существует два пути метаболизма гистамина в организме человека: окислительное дезаминирование под действием диаминооксидазы и кольцевое метилирование с помощью гистамин-N-метилтрансферазы [3]. Непереносимость

¹ ОФС. 1.1.1.0019 Испытание на гистамин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

гистамина возникает в результате нарушения равновесия между накопленным гистамином и способностью к его метаболизму. У здоровых людей гистамин может быстро нейтрализоваться аминоксидазами, в то время как люди с низкой активностью аминоксидаз подвержены риску возникновения зуда, головной боли, риноконъюнктивальных симптомов, гипотонии, аритмии, гиперемии, диареи и других состояний [4].

В организме человека гистамин является центральным медиатором аллергической реакции. Воздействие аллергена на пациентов с сенсибилизацией иммунной системы вызывает высвобождение гистамина в базофилах (тучных клетках) [5]. Гистамин также может образовываться в результате поступления веществ, инициирующих процесс его биосинтеза. Гистамин синтезируется из аминокислоты гистидина при участии фермента L-гистидиндекарбоксилазы, коферментом которого является пиридоксальфосфат:



Возможен и экзогенный путь поступления данного амина, например, употребление богатой гистамином пищи или прием ЛС, загрязненных гистамином.

Существует несколько возможных путей загрязнения ЛС примесью гистамина. Основная причина загрязнения ЛС, получаемых из тканей и органов животных, — нарушение технологического процесса на этапе работы с сырьем. К таким ЛС относят, например, аprotинин, который получают из органов крупного рогатого скота. Неправильное хранение или нарушение сроков обработки могут привести к загрязнению продукции как гистамином, так и другими вазоактивными соединениями [6].

Возможно также загрязнение гистамином ЛС, получаемых путем ферментации. Примером такой субстанции служит даунорубин гидрохлорид, представляющий собой смесь компонентов, продуцируемых определенными штаммами микроорганизмов (*Streptomyces coeruleorubidus*, *Streptomyces peucetius*). В таком случае загрязнение гистамином может происходить в результате наличия в питательных средах пептона животного происхождения, богатого гистидином,

например рыбного [1]. Избыток гистидина в питательной среде может привести к синтезу гистамина при использовании в производстве штаммов-продуцентов, способных декарбоксировать гистидин (например, *Escherichia coli*, бактерий родов *Lactobacillus*, *Staphylococcus*) или при контаминации микроорганизмами с гистидин-декарбоксилазной активностью.

Помимо субстанций аprotинина и даунорубина гидрохлорида, Европейская фармакопея (Ph. Eur.) ранее устанавливала требования к контролю примеси гистамина в трипсине² и химотрипсине³. Стандартная методика, изложенная в общей фармакопейной статье (ОФС) «Испытание на гистамин» ГФ РФ⁴, включает в себя регистрацию сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в изотонических условиях в ответ на введение растворов, содержащих известные концентрации гистамина дигидрохлорида и испытуемого раствора. Однако в условиях гармонизации с ведущими фармакопеями мира и реализации концепции 3R (Замена, Сокращение, Усовершенствование; Replacement, Reduction, Refinement) использование животных при проведении биологического испытания на гистамин неэтично. Кроме того, данное *in vivo* испытание требует большого количества времени, является неспецифичным и приводит к вариативным результатам [7].

В результате предыдущих исследований была установлена возможность использования метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в различных модификациях для идентификации гистамина в конкретных ЛС [1, 6]. В данной работе проведен более подробный анализ ВЭЖХ-методик, используемых для количественного определения примеси гистамина, а также оценена возможность использования иммунохимических методов анализа.

Цель работы — выбор перспективного *in vitro* метода количественного определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

Задачи исследования:

- сравнительный анализ фармакопейных подходов контроля содержания гистамина в ЛС;
- анализ возможности использования физико-химических и иммунохимических методов количественного определения гистамина;

² Trypsin. European Pharmacopoeia. 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021.

³ Chymotrypsin. European Pharmacopoeia. 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021.

⁴ ОФС.1.1.1.0019 Испытание на гистамин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

- обоснование выбора перспективного *in vitro* метода для определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

Исследование было проведено информационно-аналитическим методом. База источников литературы состоит из научных статей (1996–2024 гг.), доступных в РИНЦ и Scopus. Ключевые слова поиска: гистамин, примесь, количественное определение, биологические испытания, физико-химические методы, ВЭЖХ, иммуноферментный анализ (ИФА). Объектной базой исследования послужили фармакопеи: Ph. Eur., Фармакопея США (USP), Фармакопея Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и ГФ РФ⁵.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Подход к испытанию ЛС на содержание примеси гистамина различается в различных зарубежных фармакопеях. В настоящее время *in vivo* методика определения гистамина, изложенная в монографии Ph. Eur., аналогична методике, представленной в ГФ РФ. Стратегия Ph. Eur. направлена на переход от биологических методов испытаний к физико-химическим. В соответствии с утвержденным планом реализации проекта планируется исключение монографии 2.6.10 «Histamine»⁶ из Ph. Eur. 01.01.2026 после выпуска издания 12.1. Кроме того, заявлена разработка монографии 2.5.47 «Histamine in active substances», в которой будут описаны *in vitro* методы определения гистамина, в частности ВЭЖХ и ИФА⁷.

В документе Европейского директората по качеству ЛС и здравоохранения, помимо стратегии исключения биологических испытаний на гистамин и депрессорные вещества из Ph. Eur., описаны основные причины проведения испытаний на животных [7]. Авторы документа утверждают, что большинство *in vivo* методов возникли, когда:

- 1) не была широко распространена надлежащая производственная практика (GMP);
- 2) отсутствовали документы, описывающие требования к валидации методик, например, руководства Международного совета

по гармонизации технических требований к ЛС для медицинского применения (ICH) Q2 (R2)⁸; 3) физико-химические и другие *in vitro* методы были малодоступны.

Развитие современных аналитических методов и внедрение GMP привели к пересмотру взглядов о проведении некоторых испытаний на животных. Например, уже в 1995 г. для ряда монографий Ph. Eur. требования к качеству ЛС по определению примесей гистамина и депрессорных веществ были перенесены в раздел «Производство» и, соответственно, перестали быть обязательными для каждой партии ЛС. Такое решение было принято после анализа данных, свидетельствующих о прохождении вышеперечисленных испытаний в течение значительного периода времени. Соответствующие разделы были оставлены в Ph. Eur. для того, чтобы производители при необходимости могли использовать эти испытания при разработке ЛС⁹.

В 2000 г. с целью сокращения количества испытаний на животных была введена монография «Products of fermentation» (1468)¹⁰. Хотя гистамин и депрессорные вещества не упоминались в этой версии общей монографии, в тексте было указано, что процесс обработки ЛС должен удалять нежелательные продукты трансформации субстратов и прекурсоров или сокращать их количество до минимума.

В 2017 г. сообщалось о нежелательных реакциях, вызванных использованием растворов гентамицина сульфата для инъекций. Было установлено загрязнение субстанции гентамицина сульфата гистамином. Расследование показало, что загрязнение связано с использованием в процессе ферментации сырья рыбного пептона низкого качества. Поскольку эта проблема актуальна для любых продуктов ферментации, общая монография «Products of fermentation» была пересмотрена в 2018 г. В подраздел «Исходное сырье» раздела «Производство» был добавлен следующий тезис: «Особое внимание следует уделять уровню свободного гистидина в рыбных пептонах, поскольку при определенных условиях его присутствие может приводить к образованию гистамина»¹¹. Позднее,

⁵ European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025. United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025. Фармакопея ЕАЭС. М.; 2020. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

⁶ 2.6.10. Histamine. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

⁷ <https://www.edqm.eu/en/>

⁸ ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures. EMA/CHMP/ICH/82072/2006.

⁹ <https://www.edqm.eu/en/d/296687>

¹⁰ Products of fermentation. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

¹¹ European Pharmacopoeia. Edition Supplement 9.6. Strasbourg: EDQM; 2019.

в 2020 г., раздел «Последующая обработка» был дополнен¹²: «Необходимо продемонстрировать, что выбранные процедуры сводят к минимуму или обеспечивают полное удаление гистамина и других биогенных аминов из рыбы и рыбопродуктов, используемых в качестве исходного сырья»¹³.

Стратегия ГФ РФ также направлена на сокращение биологических испытаний. Так, например, в тексте ОФС «Испытание на гистамин», утвержденной приказом Минздрава России¹⁴, указано, что описанный метод применяют при фармацевтической разработке ЛС, а также при оценке пригодности технологического процесса. Таким образом, как и в случае Ph. Eur., выполнение испытания не обязательно для каждой партии ЛС.

В КНР, в отличие от стран ЕС, не планирует отказ от биологических испытаний на гистамин. Монография «Испытание на гистамин» Фармакопеи КНР¹⁵ содержит более подробное описание методики испытания, чем аналогичные монографии ГФ РФ и Ph. Eur., в том числе указан диапазон концентраций гистамина двух стандартных растворов, а дополнительно специфицируется пол используемых для испытаний морских свинок.

Методики, описанные в Британской фармакопее, Индийской фармакопее и Фармакопее Бразилии¹⁶, полностью соответствуют методикам Ph. Eur. и ГФ РФ. Фармакопея Бразилии помимо испытаний на гистамин и депрессорные вещества содержит биологическое испытание на вазопрессорные вещества, проводимое на крысах. Однако такой подход не встречается в фармакопеях других стран. В Корейской фармакопее¹⁷ для определения содержания гистамина и других депрессорных веществ используют в качестве тест-моделей кошек. В 11 издании Международной фармакопеи¹⁸ монографии с требованиями испытаний на гистамин и депрессорные вещества были исключены, рассматриваемые монографии также отсутствуют в Японской фармакопее¹⁹ и Фармакопее Таиланда²⁰.

Согласно требованиям Фармакопеи США²¹ контроль депрессорных веществ не предусмотрен, а испытание на гистамин представлено в формате общей главы <426> Histamine test method²², содержащей описание методики ВЭЖХ для определения гистамина в субстанции гентамицина сульфата. В тексте главы указано, что методика валидирована только для гентамицина сульфата, не является универсальной и должна быть валидирована для любых других субстанций. Биологические методы испытания на гистамин в Фармакопее США не представлены.

Анализ данных литературы позволил установить, что ВЭЖХ является наиболее часто используемым физико-химическим методом количественного определения примеси гистамина. Однако высокая полярность молекулы гистамина приводит к плохому удерживанию в типичных для обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) условиях. Также гистамин не обладает необходимыми абсорбционными свойствами в видимом и ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, что затрудняет использование УФ-детектора для его обнаружения. По этим причинам перед ОФХ, как правило, проводят дериватизацию гистамина с использованием флуоресцентных или ион-парных реагентов. Примерами таких реагентов являются дансилхлорид и 9-фторенилметил хлорформиат [8, 9]. Также могут быть использованы комбинации дериватизирующих агентов со стабилизаторами образующихся аддуктов, например *o*-фталевый альдегид с 3-меркаптопропионовой кислотой или с *N*-ацетил-*L*-цистеином [10, 11].

Несмотря на преимущества, дериватизация не только требует много времени и средств, но и может привести к ряду дополнительных проблем. Так, для испытуемых растворов, содержащих несколько полярных функциональных групп, реакции дериватизации часто приводят к образованию побочных продуктов и не являются количественными. Еще один недостаток дериватизации заключается в том, что основным фактором удерживания будет присоединенная

¹² European Pharmacopoeia. Edition Supplement 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021.

¹³ EMA. Quality of medicines questions and answers: Part 1. EMA; 2021.

¹⁴ Приказ Минздрава России от 11.04.2025 № 188 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей».

¹⁵ 1146 Test for Histamine. Chinese Pharmacopoeia. 2020 Edition.

¹⁶ 2.6.10. Histamine. British Pharmacopoeia. 2025; 2.2.7. Histamine. Indian Pharmacopoeia. Ed. 9.0. 2022; 5.5.2.5. HISTAMINE. The Brazilian Pharmacopoeia. 6th ed. 2019.

¹⁷ Histamine. Korean Pharmacopoeia. 12th ed. 2024.

¹⁸ The International Pharmacopoeia. 11th ed. 2023.

¹⁹ Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. 2021.

²⁰ Thai Pharmacopoeia 2020.

²¹ United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025.

²² <426> Histamine test method. United States Pharmacopoeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025.

гидрофобная группа, поэтому близкородственные соединения после дериватизации будут разделяться хуже [12]. Добавление ион-парных реагентов может привести к снижению чувствительности при гидрировании на масс-спектрометре [13].

Примером методики, основанной на ОФХ и не требующей модификации гистамина, является упомянутая методика его определения в субстанции гентамицина сульфата. Еще один вариант реализации ВЭЖХ без предварительной дериватизации – проведение нормально-фазовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором [14]. Такой вариант был также использован для количественного определения примеси гистамина в гентамицина сульфате [15]. Промежуточная прецизионность методики составила 8,0%, повторяемость (в процентах относительно стандартного отклонения) – 10,8%, а предел количественного определения – 1,1 ppm.

Другой пример – разработанная белорусскими учеными методика определения гистамина, которая не только не требует масс-спектрометрического детектора (используется флуоресцентный детектор), но и основана на проведении ОФХ [16]. Для этой методики были продемонстрированы избирательность, повторяемость и правильность, а также определены линейность

в диапазоне 20–200 мг/кг, предел обнаружения – 6,6 мг/кг и предел количественного определения – 20,0 мг/кг. Однако необходимо отметить, что данная методика разработана для определения гистамина в рыбе и рыбной продукции.

В таблице 1 представлены основные параметры методик определения гистамина методом ВЭЖХ. Из данных таблицы следует, что универсального подхода не существует, условия проведения хроматографического анализа будут зависеть от свойств и строения матрицы конкретной исследуемой субстанции. Для субстанций, обладающих отличными от гистамина строением и (или) свойствами, например для гепаринов, возможно проведение анализа методом ВЭЖХ. В этом варианте также допустимо проведение предколоночной дериватизации, так как при отсутствии близкородственных соединений дериватирующий агент будет специфично присоединяться к гистамину.

Кроме ВЭЖХ применяют другие физико-химические методы анализа. Например, несмотря на низкую летучесть гистамина, существует ряд методик его определения методом газовой хроматографии (ГХ). В статье [17] авторы используют N,O-бис(триметилсилил)ацетамид в качестве дериватирующего агента, затем проводят паровый анализ на капиллярной колонке и определяют гистамин

Таблица 1. Основные параметры методик определения гистамина методом ВЭЖХ

Table 1. Main parameters of HPLC analytical procedures for histamine determination

Дериватирующий агент <i>Derivatisation agent</i>	Вариант хроматографии <i>HPLC type</i>	Режим элюирования <i>Elution mode</i>	Детектор <i>Detector</i>
Дансилхлорид <i>Dansyl chloride</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Квадрупольный масс-анализатор <i>Quadrupole mass analyser</i>
Дансилхлорид <i>Dansyl chloride</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Изократический <i>Isocratic</i>	Спектрофотометрический на диодной матрице <i>Diode array spectrophotometric detector</i>
9-Фторенилметил хлорформат <i>9-Fluorenylmethyl chloroformate</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Изократический <i>Isocratic</i>	Флуоресцентный <i>Fluorescence</i>
орто-Фталевый альдегид и 3-меркаптопропионовая кислота / дитиотреитол / ацетилцистеин <i>o-Phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid / dithiothreitol / acetylcysteine</i>	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Флуоресцентный или УФ <i>Fluorescence or UV</i>
–	Нормально-фазовая <i>Normal-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Квадрупольный масс-анализатор <i>Quadrupole mass analyser</i>
–	Обращенно-фазовая <i>Reverse-phase</i>	Градиентный <i>Gradient</i>	Масс-анализатор <i>Mass analyser</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» – отсутствие стадии дериватизации.

Note. –, no derivatisation stage.

количественно с помощью пламенно-ионизационного детектора и качественно с помощью масс-спектрометра. Газохроматографическая методика без использования дериватирующих агентов была успешно применена для количественного определения примеси гистамина в рыбных продуктах и мясе креветок [18]. Также для определения гистамина используют тонкослойную хроматографию и капиллярный электрофорез [19, 20].

Кроме физико-химических методов для количественного определения гистамина используют иммунохимические методы анализа. Существует множество коммерческих наборов (тест-систем), однако большинство из них разработано для определения гистамина как пищевого аллергена в продуктах питания²³. Такие тест-системы, как правило, основаны на «сэндвич» (непрямом неконкурентном гетерогенном) варианте ИФА. Для определения гистамина в биологических объектах (в плазме, моче, цельной крови, супернатантах клеточных культур, экстрактах твердых биологических образцов и др.) используют принцип непрямого конкурентного гетерогенного ИФА. При этом существуют 2 способа проведения такого анализа:

- 1) с предварительной сорбцией антигена на планшете. В этом варианте антиген испытуемого образца конкурирует с иммобилизованным на планшете антигеном за связывание с определенным количеством меченого антитела;
- 2) с предварительной сорбцией антитела на планшете. В этом варианте меченый антиген и антиген испытуемого образца конкурируют за связывание с первичным антителом, иммобилизованным на лунки планшета.

Методика определения гистамина, основанная на непрямом конкурентном гетерофазном ИФА, описана в статье L. Xu и соавт. [21]. Авторы продемонстрировали линейность методики в диапазоне от 100,0 нг/мл до 10,0 мкг/мл. Было показано, что методика позволяет количественно определять гистамин в рыбном пептоне, продуктах питания (креветки, соевый соус), а также в субстанциях антибиотиков (гентамицин, амикацин и пенициллин). Открываемость для образцов данных субстанций, загрязненных гистамином, составляла 76,8–120,0%, предел обнаружения — 89,0 нг/мл. Таким образом, методика позволяет количественно определить экзогенный гистамин в загрязненной примеси гистамина ЛС.

Согласно данной методике, на лунки планшета иммобилизуют конъюгат «гистамин — овалбумин» (Гис-Ова) или «гистамин — бычий сывороточный альбумин» (Гис-БСА). Иммобилизацию гистамина, как правило, проводят в составе конъюгата, так как гистамин является гаптеном (низкомолекулярным веществом, приобретающим необходимую антигенность при увеличении молекулярной массы). Свободные участки связывания белков блокируют 2% (м/о) раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере. После трехкратной промывки в соответствующие лунки вносят разведения стандартного образца (гистамина дигидрохлорида) и испытуемого образца, а затем моноклональные антитела к гистамину в фосфатном буфере. Инкубируют, проводят аналогичную промывку. Далее планшеты инкубируют с конъюгатом козьих поликлональных антител к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена. Планшеты промывают еще раз. Затем в планшеты добавляют субстрат — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и инкубируют. Ферментативную реакцию останавливают добавлением 2 М H₂SO₄. Значения абсорбции измеряют при 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра. Количество гистамина в испытуемых растворах рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям гистамина дигидрохлорида. Сигнал обратно пропорционален количеству антигена в разведениях испытуемого образца.

В другой методике, также включающей стадию предварительной сорбции конъюгатов Гис-Ова или Гис-БСА, конкурентный ИФА-метод используют для определения эндогенного гистамина в образцах сыворотки крови пациентов с аллергическими заболеваниями [22]. Основные этапы испытания аналогичны представленным в статье [21]. Специфичность методики была доказана добавлением в реакционную среду близкородственных гистамину соединений (серотонин, дофамин, β-эндорфин, дерморфин). Максимальное значение конкурентного ингибирования составило 2% при анализе образцов с серотином, при этом максимальная чувствительность метода составила 2,50 нг/мл.

В другом варианте выполнения анализа предусмотрена предварительная иммобилизация на микропланшет специфичных к гистамину антител²⁴. Производитель тест-системы заявляет об открываемости методики в интервале 111–131% при испытании образцов сыворотки

²³ https://kolba24.ru/product/agraquant_gistamin/

https://stylab-shop.com/product/gistamin_test-sistema_evrika_al0301-48_dlya_kolichestvennogo_opredeleniya_metodom_ifa_48_opredeleniy_10228.html

²⁴ <https://www.abcam.com/en-us/products/elisa-kits/histamine-elisa-kit-ab213975#tab=datasheet>

крови. При этом предел количественного определения составляет 0,098 нг/мл, максимальное значение внутрилабораторной прецизионности – 8,5%, межлабораторной прецизионности – 11,8%. После стадии сорбции антител на планшет в лунки вносят разведения стандартного образца и испытуемого образца с немеченым гистамином. Далее вносят меченый гистамин (конъюгат гистамина с биотином) и проводят инкубацию. Осуществляют промывку, удаляя несвязанные конъюгаты. Во все лунки вносят раствор стрептавидина или авидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубируют. Планшет промывают для удаления избытка конъюгата. Субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин добавляют в лунки и инкубируют. Для остановки ферментативной реакции добавляют стоп-раствор. Интенсивность реакции определяют при длине волны 450 нм. Количество гистамина в исследуемых образцах рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям в разведениях стандартного образца гистамина.

Количественное определение примеси гистамина с использованием методики ИФА наиболее подходит для варианта, когда гистамин имеет сходие с исследуемой субстанцией строение и (или) свойства. В этом варианте влияние матрицы должно быть минимальным за счет высокой специфичности антител к гистамину. Такой способ может подойти, например, для определения гистамина в аprotинине.

Отечественные тест-системы, основанные на ИФА, способны определять гистамин в про-

дуктах питания. Однако доступные коммерческие наборы для количественного определения примеси гистамина в субстанциях для фармацевтического применения отсутствуют. Это обуславливает необходимость разработки собственных методик и тест-систем, в основе которых может быть использован принцип непрямого конкурентного гетерогенного ИФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Загрязнение гистамином ЛС может возникнуть при использовании в производстве сырья животного происхождения, богатого гистидином, а также в результате нарушения технологического процесса. Ведущие фармакопеи отказываются от биологических испытаний каждой партии ЛС, указывая на необходимость их проведения только при разработке производства и оценке пригодности технологического процесса. Полный отказ от биологических испытаний на гистамин возможен только при переходе к методам *in vitro*, наиболее перспективными из которых являются ВЭЖХ и ИФА. Проведенный анализ позволяет сделать вывод, что выбор и разработка метода количественного определения примеси гистамина должны быть основаны на составе, строении и свойствах матрицы исследуемой субстанции. Для субстанций, обладающих отличными от гистамина составом и (или) свойствами, например, для гепаринов, подходит проведение анализа с применением ВЭЖХ. Для субстанций, имеющих сходнее с гистамином строение, таких как аprotинин, наиболее перспективным является метод ИФА.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чечетова ЕО, Батуашвили ТА, Неугодова НП. Анализ современных подходов к контролю содержания депрессорных веществ. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(5):553–60. Chechetova EO, Batuashevili TA, Neugodova NP. Analysis of modern approaches to control the content of depressor substances. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(5):553–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-553-560>
2. Marieb EN, Hoehn K. *Human anatomy & physiology*. 12 ed. Pearson; 2024.
3. Schwelberger HG, Falus A. Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. In: *Histamine: biology and medical aspects*. Budapest, Hungary; 2004. P. 89–109.
4. Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(5):1185–96. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>
5. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine release from mast cells and basophils. In: *Histamine and histamine receptors in health and disease*; 2017. P. 121–39. https://doi.org/10.1007/164_2017_18
6. Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Неугодова НП, Шадрин ПВ. Методические подходы к определению депрессорных веществ в лекарственных средствах. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2020;10(2):137–41. Batuashevili TA, Simutenko LV, Neugodova NP, Shadrin PV. Methodological approaches to the determination of depressor substances in drugs. *Regulatory studies and expertise of medicinal products*. 2020;10(2):137–41 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-137-141>
7. Bratos M, Kolaj-Robin O, Antoni M, Charton E. Ph. Eur. testing for histamine and depressor substances using guinea-pigs and cats: the end of an era. Strategy for removal of animal tests for histamine and depressor substances and their vestiges from the Ph. Eur. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2024;2024:12–26.
8. Tsiassioti A, Zacharis C, Tzanavaras P. Derivatization strategies for the determination of histamine in food samples: A review of recent separation-based methods. *TrAC Trends Anal Chem*. 2023;168:117302. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117302>
9. Malle P, Vallé M, Bouquelet S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J AOAC Int*. 1996;79(1):43–9. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.1.43>
10. Mengerink Y, Kutlân D, Tóth F, et al. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino

- acid and amine derivatives obtained with the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry study. *J Chromatogr A*. 2002;949(1-2):99–124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01282-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01282-1)
11. Ларионова ДА, Штыков СН, Белоглазова НВ, Королева ЕН. Влияние нуклеофильных агентов и организованных сред на флуориметрическое определение гистамина с О-фталевым альдегидом. *Журн. аналит. химии*. 2008;63(11):1147–53. Larionova DA, Shtykov SN, Beloglazova NV, Koroleva EN. Effect of nucleophilic agents and organized media on the fluorimetric determination of histamine with o-phthalic aldehyde. *J Anal Chem*. 2008;63:1044–50. EDN: [LLICTZ](https://doi.org/10.1002/jssc.200600199)
 12. Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*. 2006;29(12):1784–821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>
 13. Shou W, Naidong W. Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (HILIC-ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds. *J Chromatogr B*. 2005;825(2):186–92. <https://doi.org/10.1016/j.chromb.2005.01.011>
 14. Nelis M, Decraecker L, Boeckstaens G, et al. Development of a HILIC-MS/MS method for the quantification of histamine and its main metabolites in human urine samples. *Talanta*. 2020;220:121328. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121328>
 15. Gaudiano M, Valvo L, Rodomonte A. A Q-TOF LC/MS method for identification and quantitation of Histamine in the antibiotic Gentamicin at ppm level: Validation and uncertainty evaluation. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;162:158–63. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.015>
 16. Почицкая ИМ, Рослик ВЛ, Григорьева ЮД. Расчет метрологических характеристик методики определения гистамина в рыбе и рыбной продукции. В кн.: *Наука, питание и здоровье. Материалы II Международного конгресса*. Минск; 2019. С. 580–9. Pochitskaya IM, Roslik VL, Grigorieva YuD. Calculation of metrological characteristics of the method for determining histamine in fish and fish products. In: *Science, nutrition and health. Proceedings of the II International Congress*. Minsk; 2019. P. 580–9 (In Russ.). EDN: [RSUGKV](https://doi.org/10.32802/asmscj.2021.809)
 17. Munir M, Mackeen M, Heng L, Badri K. Study of histamine detection using liquid chromatography and gas chromatography. *ASM Sc J*. 2021;16:1–9. <https://doi.org/10.32802/asmscj.2021.809>
 18. Hwang B, Wang J, Choong Y. A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. *Food Chem*. 2003;82(2):329–34. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00005-0)
 19. Kvasnička F, Kavková S, Honzlová A. Electrophoretic determination of histamine. *J Chromatogr A*. 2019;1588:180–4. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.024>
 20. Tao Z, Sato M, Han Y, et al. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination. *Food Control*. 2011;22(8):1154–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.014>
 21. Xu L, Zhou J, Eremin S, Dias A, Zhang X. Development of ELISA and chemiluminescence enzyme immunoassay for quantification of histamine in drug products and food samples. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412:4739–47. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02730-5>
 22. Другова ЕД, Мягкова МА. Иммуноферментный метод определения гистамина. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;(6-5):891–4. Drugova ED, Myagkova MA. Enzyme immunoassay for histamine determination. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(6-5):891–4 (In Russ.). EDN: [WAPCFP](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02730-5)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.А. Смирягин — написание текста рукописи, формулировка выводов и поиск источников литературы; О.Г. Корнилова — концепция работы, редактирование текста рукописи; В.Л. Багирова — утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Egor A. Smiryagin wrote the manuscript, formulated conclusions and performed literature search. Olga G. Kornilova developed the work concept and manuscript editing. Valeria L. Bagirova approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Смирягин Егор Антонович / Egor A. Smiryagin

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-9584-0777>

Корнилова Ольга Геннадьевна, д-р фарм. наук / Olga G. Kornilova, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>

Багирова Валерия Леонидовна, д-р фарм. наук, профессор / Valeria L. Bagirova, Dr. Sci. (Pharm.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-6158>

Поступила 09.07.2025

После доработки 07.08.2025

Принята к публикации 07.08.2025

Received 9 July 2025

Revised 7 August 2025

Accepted 7 August 2025