УДК 615.11:111.11

Обзор / Review

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

**Е.А. Смирягин**🖂, **О.Г. Корнилова, В.Л. Багирова**

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 Н1-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* испытания 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 подробный анализ стратегии Европейской фармакопеи, направленной на отказ от биологических испытаний на содержание примеси гистамина в ЛС. На основании 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.** Перспективными методами для количественного определения примеси гистамина в биологических лекарственных средствах являются 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 апротинина – ИФА.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

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

**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.

## Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

## Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Egor A. Smiryagin**🖂, **Olga G. Kornilova**, **Valeria L.** **Bagirova**

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 in detail. 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

**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.

## 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. 056-00026-24-01 (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]](#footnote-1) испытание на депрессорные вещества проводят для гепарина натрия, эноксапарина натрия, даунорубицина гидрохлорида, доксорубицина гидрохлорида, митомицина 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 диаминоксидазы и кольцевое метилирование с помощью гистамин-N-метилтрансферазы [3]. Непереносимость гистамина возникает в результате нарушения равновесия между накопленным гистамином и способностью к его метаболизму. У здоровых людей гистамин может быстро детоксифицироваться аминооксидазами, в то время как люди с низкой активностью аминооксидаз подвержены риску возникновения зуда, головной боли, риноконъюнктивальных симптомов, гипотонии, аритмии, гиперемии, диареи и другие состояний [4].

В организме человека гистамин является центральным медиатором аллергической реакции. Воздействие аллергена на пациентов с сенсибилизацией иммунной системы вызывает высвобождение гистамина в базофилах, или тучных клетках [5]. Гистамин также может образовываться в результате поступления веществ, инициирующих процесс его биосинтеза. Гистамин синтезируется из аминокислоты гистидин при участии фермента L-гистидиндекарбоксилазы, коферментом которого является пиридоксальфосфат. Схема синтеза гистамина приведена на *рисунке 1*. Возможен и экзогенный путь поступления данного амина, например, употребление богатой гистамином пищи или прием ЛС, загрязненных гистамином.

****

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **1** | **2** | **3** |
|  |  |  |

Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

***Рис. 1.*** *Биосинтез гистамина. 1 – гистидин; 2 – декарбоксилирование; 3 – гистамин*

***Fig. 1.*** *Histamine biosynthesis. 1, histidine; 2, decarboxylation; 3, histamine*

Существует несколько возможных путей загрязнения ЛС примесью гистамина. Для ЛС, получаемых из тканей и органов животных, основная причина загрязнения – нарушение технологического процесса на этапе работы с сырьем. К таким ЛС относят, например, апротинин, 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 даунорубицина 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 декарбоксилировать гистидин (например, *Escherichia coli*, бактерий родов *Lactobacillus*, *Staphylococcus*) или при контаминации микроорганизмами с гистидин-декарбоксилазной активностью.

Помимо субстанций апротинина и даунорубицина гидрохлорида, Европейская фармакопея (Ph. Eur.) ранее устанавливала требования к контролю примеси гистамина в трипсине[[2]](#footnote-2) и химотрипсине[[3]](#footnote-3). Стандартная методика, изложенная в общей фармакопейной статье (ОФС) «Испытание на гистамин» ГФ РФ[[4]](#footnote-4), 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 *in vitro* метода количественного определения примеси гистамина в качестве альтернативы испытаниям *in vivo*.

Задачи исследования:

• провести сравнительный анализ фармакопейных подходов контроля содержания гистамина в ЛС;

• рассмотреть физико-химические и иммунохимические методы количественного определения гистамина;

• обосновать выбор 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 РФ[[5]](#footnote-5).

**ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

Подход к испытанию ЛС на содержание примеси гистамина отличается 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,монография 2.6.10 «Histamine»[[6]](#footnote-6) будет полностью исключена из Ph. Eur. первого января 2026 г. 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 ИФА[[7]](#footnote-7).

В документе Европейского директората по качеству ЛС и здравоохранения, помимо стратегии исключения биологическихиспытаний 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. надлежащая производственная практика (GMP) не была широко распространена;
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]](#footnote-8);
3. физико-химические и другие *in vitro* методы были малодоступны.

Развитие современных аналитических методов и внедрение GMP привели к пересмотру необходимости проведения 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 могли использовать эти испытания при разработке ЛС, если это необходимо[[9]](#footnote-9).

В 2000 г. с целью сокращения количества испытаний на животных была опубликована монография «Products of fermentation» (1468)[[10]](#footnote-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 до минимума.

В 2017 г. сообщалось о нежелательных реакциях, вызванных использованием растворов для инъекций гентамицина сульфата. 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» было добавлено следующее предложение: «Особое внимание следует уделять уровню свободного гистидина в рыбных пептонах, поскольку его присутствие может приводить к образованию гистамина при определенных условиях»[[11]](#footnote-11). Позднее, в 2020 г., раздел «Последующая обработка» был дополнен[[12]](#footnote-12) следующей информацией: «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]](#footnote-13).

Стратегия ГФ РФ также направлена на сокращение биологических испытаний. Например, в тексте ОФС «Испытание на гистамин», утвержденной приказом Минздрава России № 188 от 11.04.2025[[14]](#footnote-14), указано, что описанный метод применяют при фармацевтической разработке ЛС, а также при оценке пригодности технологического процесса. Таким образом, аналогично Ph. Eur., выполнение испытания не обязательно для каждой партии ЛС.

Фармакопея КНР[[15]](#footnote-15), в отличие от Ph. Eur., не планирует отказ от биологических испытаний на гистамин. Монография «Испытание на гистамин» (1146) фармакопеи КНР содержит более подробное описание методики испытания, чем аналогичные монографии ГФ РФ и Ph. Eur.. Например, в тексте указан приблизительный диапазон концентраций гистамина для двух стандартных растворов, а пол используемых для испытания морских свинок дополнительно специфицируется.

Методики, описанные в Британской фармакопее, Индийской фармакопее и фармакопеи Бразилии[[16]](#footnote-16), полностью соответствуют методике 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 фармакопее[[17]](#footnote-17) для определения содержания как гистамина, так и других депрессорных веществ используют в качестве тест-моделей кошек. В 11-ом издании Международной фармакопеи[[18]](#footnote-18) монографии с требованиями испытаний на гистамин и депрессорные вещества были исключены. Аналогично, рассматриваемые монографии отсутствуют в Японской фармакопее[[19]](#footnote-19) и фармакопее Таиланда[[20]](#footnote-20).

В соответствии с требованиями фармакопеи США[[21]](#footnote-21), контроль депрессорных веществ не предусмотрен, а испытание на гистамин представлено в формате общей главы <426> Histamine test method[[22]](#footnote-22), содержащей описание методики ВЭЖХ для определения гистамина в субстанции гентамицина сульфата. В тексте главы указано, что методика валидирована только для гентамицина сульфата, т.е. 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-химическими методом количественного определения примеси гистамина. Однако его высокая полярность 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, *о*-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 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 (НФХ) 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 относительного 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.

***Таблица 1.*** *Основные параметры методик определения гистамина методом ВЭЖХ*

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Дериватизирующий агент**  ***Derivatisation agent*** | **Вариант хроматографии**  ***HPLC type*** | **Режим элюирования**  ***Elution mode*** | **Детектор**  ***Detector*** |
| Дансилхлорид  *Dansyl chloride* | Обращенно-фазовая  *Reverse-phase* | Градиентный  *Gradient* | Квадрупольный масс-анализатор  *Quadrupole mass analyser* |
| Дансилхлорид  *Dansyl chloride* | Обращенно-фазовая  *Reverse-phase* | Изократический  *Isocratic* | Спектрофотометри-ческий на диодной матрице  *Diode array spectrophotometric detector* |
| 9-фторенилметил хлорформиат  *9-**Fluorenylmethyl chloroformate* | Обращенно-фазовая  *Reverse-phase* | Изократический  *Isocratic* | Флуоресцентный  *Fluorescence* |
| орто-фталевый альдегид и 3-меркаптопропионовая кислота/дитиотреитол/ацетилцистеин  *o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid/ dithiothreitol/ acetylcysteine* | Обращенно-фазовая  *Reverse-phase* | Градиентный  *Gradient* | Флуоресцентный  или УФ  *Fluorescence or UV* |
| – | Нормально-фазовая  *Normal-phase* | Градиентный  *Gradient* | Квадрупольный масс-анализатор  *Quadrupole mass analyser* |
| – | Обращенно-фазовая  *Reverse-phase* | Градиентный  *Gradient* | Масс-анализатор  *Mass analyser* |

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

**Примечание.** «–» – отсутствие стадии дериватизации.

**Note.** –, no derivatisation stage.

Из приведенной 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 с помощью ВЭЖХ. В этом варианте также допустимо проведение предколоночной дериватизации, так как при отсутствии близкородственных соединений дериватизирующий 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 дериватизирующего агента, а затем проводят паро-фазный анализ на капиллярной колонке и определяют гистамин количественно с помощью пламенно-ионизационного детектора и качественно с помощью масс-спектрометра. Газохроматографическая методика без использования дериватизирующих 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 питания[[23]](#footnote-23). 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 первом способе проведения непрямого конкурентного гетерофазного 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 разработанная методика позволяет количественно определять гистамин в рыбном пептоне, различных продуктах питания (креветки, соевый соус), а также в субстанциях антибиотиков (гентамицин, амикацин и пенициллин). При этом открываемость для образцов данных субстанций, загрязненных гистамином, лежала в интервале 76,8–120,0%, а предел обнаружения составил 89,0 нг/мл. Таким образом, методика позволяет количественно определить экзогенный гистамин в загрязненных примесью гистамина ЛС. В представленной методике на лунки планшета иммобилизуют конъюгат гистамин-овальбумин (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 M 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 L. Xu и соавт. [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 серотонином. При этом максимальная чувствительность метода составила 2,50 нг/мл.

В другом варианте выполнения анализа предусмотрена предварительная иммобилизация на микропланшет специфичных к гистамину антител[[24]](#footnote-24). Производитель тест-системы заявляет об открываемости методики в интервале 111–131% при испытании образцов сыворотки 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 измеряют 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 схожие 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 апротинине.

Отечественные тест-системы, основанные на проведении ИФА, способны определять гистамин в продуктах питания. Однако доступные коммерческие наборы для количественного определения примеси гистамина в субстанциях для фармацевтического применения отсутствуют. Это обусловливает 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 схожее с гистамином строение, таких как апротинин, 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, Batuashvili TA, Neugodova NP. Analysis of modern approaches to control the content of depressant substances. *Regulatory studies and expertise of medicinal products.* 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*. Pearson education; 12th edition. 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. *The American journal of clinical nutrition*. 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. Batuashvili 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. Tsiasioti A, Zacharis C, Tzanavaras P. Derivatization strategies for the determination of histamine in food samples: A review of recent separation-based nm – rfr d згиytnmethods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 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 of AOAC Int*. 1996;79(1):43-9. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.1.43>

10. Mengerink Y, Kutlán 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-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatography–mass spectrometry study. *J of Chromatogr A*. 2002;949(1-2):99–124. <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. *Журнал аналитической 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 of Analytical Chemistry*. 2008;63:1044–50. EDN: LLLCTZ

12. Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J of 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 of Chromatogr B*. 2005;825(2):186–92.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.011>

14. Nelis M, Decraecker L, Boeckxstaens 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 of Pharm and 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

17. Munir M, Mackeen M, Heng L, Badri K. Study of histamine detection using liquid chromatography and gas chromatography. *ASM Science Journal*. 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>

19. Kvasnička F, Kavková S, Honzlová A. Electrophoretic determination of histamine. *J of 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 and 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.). <https://s.applied-research.ru/pdf/2016/6-5/9721.pdf>

|  |  |
| --- | --- |
| **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, 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>

1. ОФС. 1.1.1.0019 Испытание на гистамин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025. [↑](#footnote-ref-1)
2. Trypsin. European Pharmacopoeia. 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021. [↑](#footnote-ref-2)
3. Chymotrypsin. European Pharmacopoeia. 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021. [↑](#footnote-ref-3)
4. ОФС.1.1.1.0019 Испытание на гистамин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025. [↑](#footnote-ref-4)
5. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025. United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025. Фармакопея ЕЭС. М.; 2020. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2025. [↑](#footnote-ref-5)
6. 2.6.10. Histamine. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025. [↑](#footnote-ref-6)
7. <https://www.edqm.eu/en/> [↑](#footnote-ref-7)
8. ICH Q2 (R2) Validation of analytical procedures. EMA/CHMP/ICH/82072/2006. [↑](#footnote-ref-8)
9. <https://www.edqm.eu/en/d/296687> [↑](#footnote-ref-9)
10. Products of fermentation. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025. [↑](#footnote-ref-10)
11. European Pharmacopoeia. Edition Supplement 9.6. Strasbourg: EDQM; 2019. [↑](#footnote-ref-11)
12. European Pharmacopoeia. Edition Supplement 10.4. Strasbourg: EDQM; 2021. [↑](#footnote-ref-12)
13. EMA. Quality of medicines questions and answers: Part 1. EMA; 2021. [↑](#footnote-ref-13)
14. Приказ Минздрава России от 11.04.2025 № 188 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей». [↑](#footnote-ref-14)
15. 1146 Test for Histamine. Chinese Pharmacopoeia. 2020 Edition. [↑](#footnote-ref-15)
16. 2.6.10. Histamine. British Pharmacopeia. 2025; 2.2.7. Histamine. Indian Pharmacopoeia. Edition 9.0. 2022; 5.5.2.5. HISTAMINE. The Brazilian Pharmacopeia. 6th Edition. 2019. [↑](#footnote-ref-16)
17. Histamine. Korean Pharmacopoeia.12th Edition. 2024. [↑](#footnote-ref-17)
18. The International Pharmacopoeia. 11th Edition. 2023. [↑](#footnote-ref-18)
19. Japanese Pharmacopoeia. 18th Edition. 2021. [↑](#footnote-ref-19)
20. Thai Pharmacopoeia 2020. [↑](#footnote-ref-20)
21. United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025. [↑](#footnote-ref-21)
22. <426> Histamine test method. United States Pharmacopeia. USP-NF. Rockville, MD; 2025. [↑](#footnote-ref-22)
23. <https://kolba24.ru/product/agraquant_gistamin/>; <https://stylab-shop.com/product/gistamin_test-sistema_evrika_al0301-> [↑](#footnote-ref-23)
24. [https://www.abcam.com/en-us/products/elisa-kits/histamine-elisa-kit-ab213975#tab=datasheet](https://www.abcam.com/en-us/products/elisa-kits/histamine-elisa-kit-ab213975" \l "tab=datasheet) [↑](#footnote-ref-24)