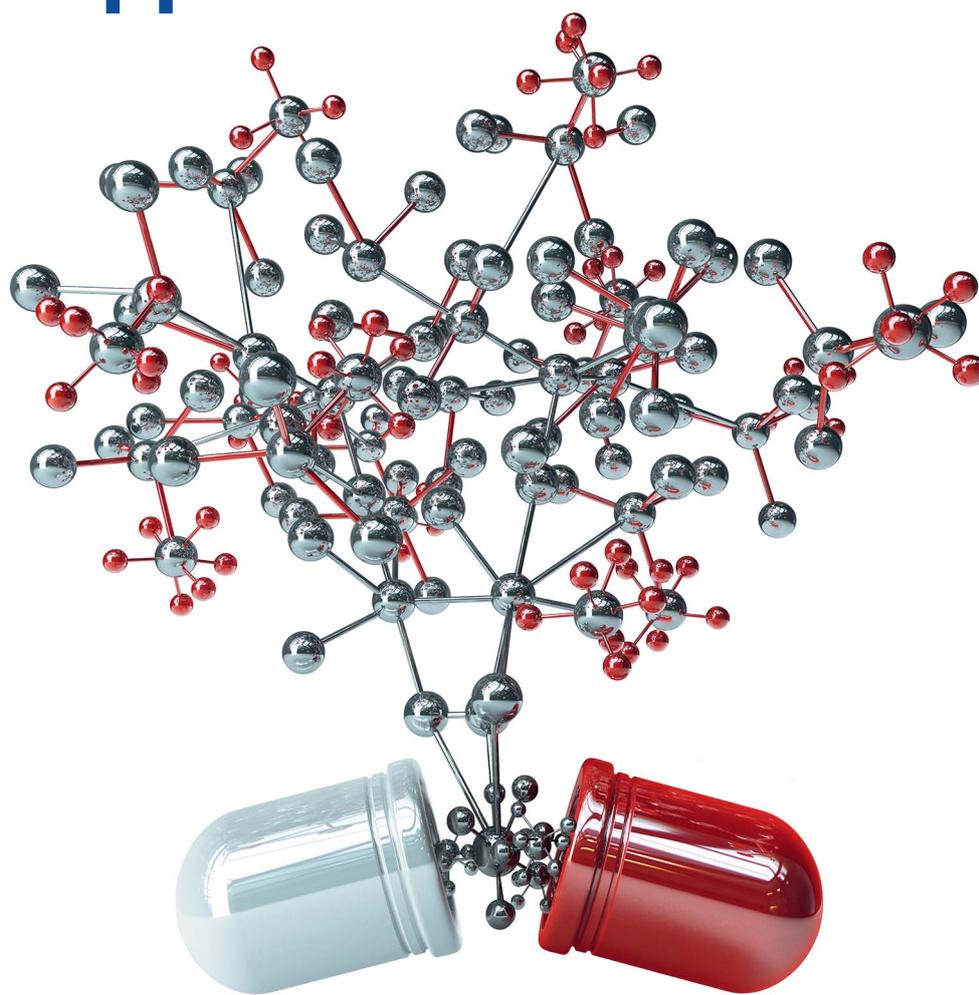


Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств



ГЛАВНАЯ ТЕМА:

Спектральные методы анализа
в экспертизе лекарственных средств



Уважаемые коллеги!

Журнал «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения», который издается уже около 20 лет, вступает в новый этап своего развития.

Начиная с этого номера, журнал выходит не только в новом дизайне, но и под новым названием – «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». Термин «регуляторные исследования» означает область знаний об инструментах, стандартах и подходах к изучению безопасности, эффективности, качеству и характеристикам лекарственных средств, подлежащих регистрации. Считаю, что новое название журнала позволит вывести журнал за рамки ведомственного издания, точнее обозначить его тематику и сделать журнал более практикоориентированным.

Главная тема данного номера журнала – «Спектральные методы анализа в экспертизе лекарственных средств».

В XXI веке при решении задач по исследованию качественного и количественного состава сложных (многокомпонентных) образцов лекарственных препаратов на ведущую позицию выходят физико-химические методы анализа, среди которых ключевую роль играют спектральные (спектроскопические) методы. Это чрезвычайно широкая группа методов, которая, несмотря на большое разнообразие принципов, лежащих в их основе, обладает рядом общих особенностей и решает сходные задачи. Благодаря высокой информативности, прецизионности и достоверности, современные варианты спектральных методов анализа позволяют получать правильные результаты исследований, выявлять мельчайшие отклонения от заявленного состава препарата, что, в конечном итоге, обеспечивает надежное решение задач в экспертизе лекарственных средств. В полной мере широкие возможности и уникальные преимущества данной группы аналитических методов раскрываются для наиболее сложных по составу препаратов. Важной особенностью спектральных методов анализа является быстрое развитие и прогресс в данной области, поэтому чрезвычайно важно следить за последними достижениями в методологии и приборостроении.

Учитывая особую роль этой группы методов в экспертизе лекарственных средств и необходимость ознакомления широкого круга специалистов с последними тенденциями и достижениями в данной области, мы подготовили тематический номер нашего журнала и надеемся, что глубокоуважаемые читатели найдут его полезным и интересным для себя.

*Искренне ваша,
главный редактор*

**Косенко
Валентина Владимировна**

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

Рецензируемый научно-практический журнал

Учредитель:

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Главный редактор:

Косенко Валентина Владимировна,
канд. фарм. наук

Шеф-редактор:

Федотова О.Ф.
тел.: +7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор:

Гойкалова О.Ю., канд. биол. наук, доц.

Научные редакторы:

Молчан Н.В., канд. фарм. наук
Хрущева М.Л., канд. хим. наук

Редактор:

Калиничев С.А., канд. фарм. наук

Редактор перевода:

Губарева О.Н., канд. филол. наук

Адрес учредителя и редакции:

127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-33, 63-41, 63-65)
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

Журнал основан в 2005 году.

Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год).

Журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных:

Chemical Abstracts (CAS), Embase, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), его архив включен в базы крупнейших агрегаторов научных ресурсов и библиотек EBSCO, WorldCat, DOAJ, Российская государственная библиотека, Академия Google (Google Scholar), КиберЛенинка, BASE, Dimensions, DOAJ, Open Archives Initiative, ResearchBib, РГБ, Соционет, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations и др.

Входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

В журнале освещаются передовые достижения по вопросам стандартизации и оценки качества лекарственных препаратов различных групп, разработки и совершенствования методик фармацевтического анализа, методологии экспертизы лекарственных средств, в том числе по установлению их взаимозаменяемости, обсуждаются новые высокотехнологичные методы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, рассматриваются актуальные проблемы фармакологии, клинической медицины, вопросы рационального применения лекарственных препаратов на основе принципов персонализированной терапии.

К публикации в журнале принимаются обзорные и оригинальные статьи, краткие сообщения, методические материалы, тематика которых соответствует фармацевтическим и медицинским отраслям науки и следующим научным специальностям:

- Фармацевтическая химия, фармакогнозия, Промышленная фармация и технология получения лекарств;
- Фармакология, клиническая фармакология;
- Акушерство и гинекология, Эндокринология, Кардиология, Психиатрия и наркология, Инфекционные болезни, Неврология, Онкология, лучевая терапия, Ревматология, Гастроэнтерология и диетология.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается
Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Подписано в печать:	31.03.2022
Дата выхода в свет	09.04.2022
Подписной индекс	в каталоге «Пресса России» – Е57942, в каталоге агентства «Урал-Пресс» – 57942

Редакционная коллегия:

Главный редактор

Косенко В.В., канд. фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Петров В.И., академик РАН, д-р мед. наук, проф., ВолгГМУ (Волгоград, Россия)

Родин И.А., д-р хим. наук, проф., МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Корсун Л.В., канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, (Москва, Россия)

Члены редакционной коллегии

Астапенко Е.М., канд. техн. наук, Минздрав России (Москва, Россия)

Бобизода Г.М., д-р биол. наук, д-р фарм. наук, проф., ТГПУ им. С. Айни (Душанбе, Республика Таджикистан)

Бунятян Н.Д., д-р фарм. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Гейн В.Л., д-р хим. наук, проф., ПГФА (Пермь, Россия)

Глаголев С.В., Минздрав России (Москва, Россия)

Горячев Д.В., д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Гравель И.В., д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Дмитриев В.А., канд. мед. наук, Ассоциация российских фармацевтических производителей (Москва, Россия)

Дурнев А.Д., член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., НИИ фармакологии им. В. В. Закусова (Москва, Россия)

Егорова С.Н., д-р фарм. наук, проф., Казанский ГМУ (Казань, Россия)

Звартау Э.Э., д-р мед. наук, проф., Первый СПбГМУ им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия)

Кайтель Сьюзан, Ph.D., Федеральный институт лекарственных средств и медицинских изделий (Бонн, Германия)

Ковалева Е.Л., д-р фарм. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Коваленко С.Н., д-р хим. наук, проф., ХНУ им. В. Н. Каразина (Харьков, Украина)

Кузьмина Н.Е., д-р хим. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Макарова М.Н., д-р мед. наук, НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Ленинградская область, Россия)

Ордабаева С.К., д-р фарм. наук, проф., Южно-Казахстанская медицинская академия (Шымкент, Республика Казахстан)

Покровский М.В., д-р мед. наук, проф., БелГУ (Белгород, Россия)

Прокофьев А.Б., д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Ремезова И.П., д-р фарм. наук, проф., ПМФИ (Пятигорск, Россия)

Рождественский Д.А., канд. мед. наук, Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК (Москва, Россия)

Самылина И.А., член-корр. РАН, д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Сычев Д.А., член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., РМАНПО (Москва, Россия)

Сюбаев Р.Д., д-р мед. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Тулегенова А.У., д-р фарм. наук, проф., Фармакопейный комитет ЕАЭС (Москва, Россия)

Хохлов А.Л., член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., ЯГМУ (Ярославль, Россия)

Шимановский Н.Л., член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф., РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Ягудина Р.И., д-р фарм. наук, проф., Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Якушева Е.Н., д-р мед. наук, проф., РязГМУ (Рязань, Россия)

Регистрация	Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82931 от 14 марта 2022 г.
Издатель	ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5
Типография	ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514
Тираж	100 экз. Цена свободная

The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Regulatory Research and Medicine Evaluation

Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya
Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv

A peer-reviewed research and practice journal

Founder:

Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation

Founded in 2005.

Published quarterly (four issues per year).

This is an open access journal indexed in Russian and international abstracting and indexing databases: Chemical Abstracts (CAS), Embase, Russian Science Citation Index (RSCI) with the archive included in major aggregator databases, such as EBSCO, WorldCat, DOAJ, Russian State Library, Google Academy (Google Scholar), CyberLeninka, BASE, Dimensions, DOAJ, Open Archives Initiative, ResearchBib, RSL, Socionet, Research4life, Lens.org, Openaire.eu, Ulrichsweb, Mendeley, Unpaywall, OpenCitations, etc.

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees.

The journal covers advances in the areas of standardisation and quality control of various groups of medicines, development and improvement of analytical test procedures, approaches to evaluation of medicinal products, including assessment of medicine interchangeability, discusses new sophisticated methods of preclinical and clinical research, relevant issues of pharmacology, clinical medicine, rational use of medicines based on personalised medicine principles.

The journal publishes reviews and original articles, brief communications, guidance materials related to medical and pharmaceutical sciences and the following specialist fields:

- Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy, Pharmaceutical formulation and manufacturing;
- Pharmacology, clinical pharmacology;
- Obstetrics and gynaecology, Endocrinology, Cardiology, Psychiatry and addiction medicine, Infectious diseases, Neurology, Oncology, Radiation therapy, Rheumatology, Gastroenterology and nutritional science.

Editor-in-Chief:

Valentina V. Kosenko,
Cand. Sci. (Pharm.)

Managing Editor:

Olga F. Fedotova
tel.: +7 (495) 121-06-00 (ext. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Executive Editor:

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

Science Editor:

Nina V. Molchan, Cand. Sci. (Pharm.)
Maria L. Khrushcheva, Cand. Sci. (Chem.)

Editor:

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor:

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philol.)

Postal address of the founder and editorial office:

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
tel.: +7 (499) 190-18-18
(ext. 63-33, 63-41, 63-65);
vedomosti@expmed.ru

www.vedomostincesmp.ru

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript
The content is licensed under Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

Passed for printing:	31.03.2022
Date of publication:	09.04.2022
Subscription codes	provided in the catalogues of Pressa Rossii – E57942
	provided in the catalogues of Ural-Press agency – 57942

© Compilation, design. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2022

Editorial Board:

Editor-in-Chief

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.) (Moscow, Russia)

Deputy Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Igor A. Rodin, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Lomonosov Moscow State University, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Executive Editor

Lilia V. Korsun, Cand. Sci. (Biol.) (Moscow, Russia)

Editorial Board Members

Elena M. Astapenko, Cand. Sci. (Tech.), Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Gulomkodir M. Bobizoda, Dr. Sci. (Biol.), Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Aini Tajik State Pedagogical University (Dushanbe, Republic of Tajikistan)

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir L. Gein, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

Sergey V. Glagolev, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Dmitry V. Goryachev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Irina V. Gravel, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Victor A. Dmitriev, Cand. Sci. (Med.), Association of the Russian Pharmaceutical Manufacturers (Moscow, Russia)

Andrey D. Durnev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Zakusov Institute of Pharmacology (Moscow, Russia)

Svetlana N. Egorova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

Edwin E. Zvartau, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (Saint Petersburg, Russia)

Susanne Keitel, Ph.D., Federal Institute for Drugs and Medical Devices (Bonn, Germany)

Elena L. Kovaleva, Dr. Sci. (Pharm.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Sergey N. Kovalenko, Dr. Sci. (Chem.), Prof., V.N. Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), Research and Manufacturing Company 'HOME OF PHARMACY' (Leningrad Region, Russia)

Saule K. Ordabaeva, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., South Kazakhstan Medical Academy (Shymkent, Republic of Kazakhstan)

Mikhail V. Pokrovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Belgorod State University (Belgorod, Russia)

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Irina P. Remezova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Pyatigorsk, Russia)

Dmitry A. Rozhdestvensky, Cand. Sci. (Med.), Department for Technical Regulation and Accreditation of the Eurasian Economic Commission (Moscow, Russia)

Irina A. Samylina, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Dmitry A. Sychev, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Moscow, Russia)

Rashid D. Syubaev, Dr. Sci. (Med.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Ardak U. Tulegenova, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Pharmacopoeial Committee of the Eurasian Economic Union

Alexander L. Khokhlov, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Yaroslavl State Medical University (Yaroslavl, Russia)

Nikolay L. Shimanovsky, Corr. Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Elena N. Yakusheva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Ryazan State Medical University (Ryazan, Russia)

Registration	The journal is registered as mass media by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS77-82931 dated March 14, 2022
Publisher	NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114
Printing office	"Triada" publishing house: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034
Print run	100 copies. Free price

Содержание

Том 12, №1 2022

ГЛАВНАЯ ТЕМА		СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В ЭКСПЕРТИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ	
<i>С.В. Моисеев, Н.Е. Кузьмина, А.И. Лутцева</i>	8	Метод ЯМР в отечественной и зарубежных фармакопеях для оценки качества лекарственных средств	
<i>Н.Е. Кузьмина, С.В. Моисеев, Е.Ю. Северинова, А.И. Лутцева</i>	24	Применение метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для анализа полисахаридов	
<i>С.В. Овсиенко, В.М. Щукин, Е.А. Блинкова, Н.Е. Кузьмина</i>	41	Определение методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой содержания тяжелых металлов, мышьяка и алюминия в лекарственном растительном сырье «Тыквы семена» и нативных продуктах на его основе	
<i>В.И. Топоркова, А.О. Понкратова, А.К. Уэйли, В.Г. Лужанин, М.Ю. Гончаров</i>	56	Применение спектральных методов анализа для установления структуры индивидуальных вторичных метаболитов, выделенных из наземной части хохлатки крупноприцветниковой	
<i>В.М. Щукин, Н.Е. Кузьмина, Ю.Н. Швецова, А.И. Лутцева</i>	65	Особенности разработки и валидации методик определения элементных токсикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах	
НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ			
<i>В.В. Косенко, Р.И. Ягудина, О.А. Леднев, В.Г. Серпик</i>	79	Анализ ассортимента лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации	
ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ			
<i>А.Д. Дурнев, А.К. Жанатаев</i>	90	Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств	
ЭКСПЕРТНОЕ МНЕНИЕ			
<i>О.В. Шаповалова, Н.П. Неугодова</i>	110	Методология расчета нормы предельного содержания бактериальных эндотоксинов	

Contents

Volume 12, No. 1 2022

MAIN TOPIC		SPECTROSCOPIC METHODS USED IN MEDICINE EVALUATION
<i>S.V. Moiseev, N.E. Kuz'mina, A.I. Luttsseva</i>	8	NMR as Used in the Russian and Foreign Pharmacopoeias for Quality Control of Medicinal Products
<i>N.E. Kuz'mina, S.V. Moiseev, E.Yu. Severinova, A.I. Luttsseva</i>	24	Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy Application for Analysis of Polysaccharides
<i>S.V. Ovsienko, V.M. Shchukin, E.A. Blinkova, N.E. Kuz'mina</i>	41	Determination of Heavy Metals, Arsenic, and Aluminum Content in Pumpkin Seed Herbal Substance and Native Products, by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
<i>V.I. Toporkova, A.O. Ponkratova, A.K. Whaley, V.G. Luzhanin, M.Yu. Goncharov</i>	56	The Use of Spectroscopic Methods for Structural Elucidation of Individual Secondary Metabolites Isolated from the Aerial Parts of <i>Corydalis bracteata</i>
<i>V.M. Shchukin, N.E. Kuz'mina, Yu.N. Shvetsova, A.I. Luttsseva</i>	65	Development and Validation of Procedures for Determination of Elemental Toxicants in Herbal Substances and Herbal Medicinal Products
NOMENCLATURE AND CLASSIFICATION OF MEDICINES		
<i>V.V. Kosenko, R.I. Yagudina, O.A. Lednev, V.G. Serpik</i>	79	Analysis of the Medicinal Products for Human Use Authorised in the Russian Federation
PRECLINICAL STUDIES		
<i>A.D. Durnev, A.K. Zhanataev</i>	90	Relevant Aspects of Drug Genetic Toxicology
EXPERT OPINION		
<i>O.V. Shapovalova, N.P. Neugodova</i>	110	Methodology for Calculating Bacterial Endotoxin Limits



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

Метод ЯМР в отечественной и зарубежных фармакопеях для оценки качества лекарственных средств

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

Изучение опыта различных национальных и мировых фармакопей в области применения метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) при контроле качества лекарственных средств актуально ввиду разработки фармакопей Евразийского экономического союза, а также с учетом политики гармонизации отечественной и международных фармакопей. Цель работы – проведение сравнительного анализа перечня показателей качества лекарственных средств, оцениваемых методом ЯМР, в отечественной и зарубежных фармакопеях. В обзоре обобщен опыт национальных и мировых фармакопей в области применения метода ЯМР при контроле качества лекарственных средств и аттестации фармакопейных стандартных образцов. Проанализированы следующие показатели, оцениваемые данным методом: подтверждение подлинности действующего вещества, определение состава соединений нестехиометрического строения и средней длины полимерной цепи в полимерах и блок-сополимерах, определение абсолютного содержания действующего вещества в лекарственном средстве, идентификация и количественное определение примесей, полиморфизм и кристалличность. Показано, что в области внедрения метода ЯМР в фармакопейный анализ лидируют Фармакопея США и Японская фармакопея. Отмечена положительная динамика внедрения метода ЯМР в Государственной фармакопее Российской Федерации. Показана необходимость внесения изменений в общие фармакопейные статьи «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» и «Стандартные образцы» Государственной фармакопей Российской Федерации XIV изд. в рамках гармонизации отечественной фармакопей с Фармакопеей Евразийского экономического союза и Европейской фармакопеей. Эти изменения заключаются в декларировании возможности прямого способа установления подлинности вещества путем комплексного анализа спектральных данных ЯМР без сравнения спектров испытуемого и стандартных образцов. При аттестации фармакопейных стандартных образцов метод ЯМР необходимо включить в перечень абсолютных методов определения чистоты химических первичных стандартных образцов.

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия; фармакопея; стандартный образец; фармакопейный анализ; контроль качества; лекарственное средство; гармонизация

Для цитирования: Моисеев С.В., Кузьмина Н.Е., Лутцева А.И. Метод ЯМР в отечественной и зарубежных фармакопеях для оценки качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(1):8–23. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-8-23>

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

NMR as Used in the Russian and Foreign Pharmacopoeias for Quality Control of Medicinal Products

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

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

ABSTRACT

The ongoing development of the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union and the current trend for harmonisation of the Russian Pharmacopoeia with the world leading pharmacopoeias suggest the necessity of studying how different pharmacopoeias use nuclear magnetic resonance (NMR) for quality control of medicinal products. The aim of the study was to compare the extent of medicine quality characteristics assessed by NMR in the Russian and foreign pharmacopoeias. The review summarises the experience of various national and world pharmacopoeias in using the NMR method for quality control of medicines and certification of pharmacopoeial reference materials. The comparative analysis covered the following quality parameters: active ingredient identification, determination of the composition of non-stoichiometric compounds, determination of the average polymer chain length in polymers and block copolymers, determination of the absolute content of the active ingredient, identification and quantification of impurities, polymorphism, and crystallinity. It was shown that the United States and Japanese Pharmacopoeias are leading the way in introducing the NMR method into pharmacopoeial analysis. There have been some positive trends in the introduction of the NMR method in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation as well. It was concluded that changes are needed in the general chapters "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" and "Reference Standards" of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed. in order to harmonise the texts with those of the Eurasian Pharmacopoeia and the European Pharmacopoeia and to allow for the possibility of direct identification of a substance by complex analysis of NMR spectral data, without comparing the test sample and the reference standard spectra. The NMR method should be included in the list of absolute methods used for determination of purity of primary chemical reference substances during certification.

Key words: NMR spectroscopy; pharmacopoeia; reference standard; pharmacopoeial analysis; quality control; medicinal product; harmonisation

For citation: Moiseev S.V., Kuz'mina N.E., Luttseva A.I. NMR as used in the Russian and foreign pharmacopoeias for quality control of medicinal products. *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):8–23. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-8-23>

Введение

Использование метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для решения аналитических задач началось с разработки концепции химического сдвига и спин-спинового взаимодействия с начала 50-х годов прошлого века. В настоящее время данный метод описан

во всех фармакопеях мира, где присутствует общая фармакопейная статья (ОФС) или монография «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»¹. В данных ОФС отражены базовые возможности метода ЯМР при решении задач контроля качества лекарственных средств (ЛС). Использование метода ЯМР для оценки

¹ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

Проект ОФС 2.2.33 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Фармакопея Евразийского экономического союза. General Monograph 2.2.33 Nuclear magnetic resonance spectrometry. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020. General Monograph 761 Nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

General Monograph 2.21 Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

некоторых показателей качества конкретных ЛС регламентируется общими и частными фармакопейными статьями (ФС). Изучение опыта различных национальных и мировых фармакопей в области применения метода ЯМР при контроле качества ЛС актуально ввиду разработки Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАЭС), а также с учетом политики гармонизации отечественной и Европейской фармакопей.

Цель работы — проведение сравнительного анализа перечня показателей качества лекарственных средств, оцениваемых методом ЯМР, в отечественной и зарубежной фармакопеях. В качестве объектов исследования использовали материалы Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV), Европейской фармакопеи 10-го изд., версии 10.5 (Ph. Eur.), Фармакопеи США 43-го изд., национальный формуляр 38 (USP), Японской фармакопеи XVII изд. (JP) и Фармакопеи Евразийского экономического союза.

Подтверждение подлинности действующего вещества лекарственного средства

Метод ЯМР позволяет решать задачу идентификации соединения двумя способами: напрямую, путем самостоятельного определения строения соединения, и косвенно, путем сравнения ЯМР-спектров испытуемого и стандартного образцов. Самостоятельную структурную интерпретацию спектров ЯМР индивидуальных соединений без использования стандартных образцов (СО) проводят путем комплексного анализа спектральных данных ЯМР (величин химических сдвигов, мультиплетности и относительной интенсивности сигналов в спектрах).

Возможность прямой идентификации структуры исследуемого образца ЛС без использования СО предусмотрена в монографиях «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» Ph. Eur., USP, JP и ФЕАЭС. В ГФ РФ XIV подобная ОФС предусматривает установление подлинности действующего вещества косвенным способом путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца (первичного или вторичного)

или с известным эталонным спектром². В то же время ГФ РФ XIV содержит ряд ОФС, допускающих прямую идентификацию соединения методом ЯМР. Так, ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов»³ рекомендует проводить установление подлинности пептидов методом ЯМР путем сравнения спектров испытуемого и стандартного образцов, но при отсутствии последнего допускается самостоятельная идентификация аминокислотного состава и определения аминокислотной последовательности испытуемого образца. В данной ОФС приведен конкретный алгоритм действий, позволяющий напрямую установить подлинность пептида. ОФС «Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин»⁴ вообще не предусматривает косвенного способа идентификации строения полисахарида путем сравнения спектров испытуемого образца и СО. В данной ОФС указано, что идентификация полисахарида происходит путем выявления в углеродном спектре сигналов, которые характеризуются определенными химическими сдвигами, уникальными для данного полисахарида с соответствующими доверительными интервалами. Следовательно, возможности метода ЯМР при установлении подлинности действующего вещества, закрепленные в ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов» и «Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин», более широкие, чем в ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса».

В ФЕАЭС, аналогично ГФ РФ XIV, косвенный способ идентификации структуры анализа методом ЯМР путем сравнения спектров испытуемого и стандартного образцов является основным⁵. Однако ФЕАЭС (в отличие от ГФ РФ XIV) в ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» допускает использование рабочего стандартного образца при отсутствии СО при условии, что ЯМР-спектр полностью совпадает с заявленной структурой материала. Такая формулировка подразумевает самостоятельную структурную интерпретацию рабочего стандартного образца методом ЯМР. Что касается конкретных химических классов соединений, ФЕАЭС рекомендует

² ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

³ ОФС.1.7.2.0036.18 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁴ ОФС.1.7.2.0014.15 Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁵ Проект ОФС 2.2.33 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Фармакопея Евразийского экономического союза.

использовать метод ЯМР только для установления подлинности пептидов⁶. В данной ОФС, аналогично соответствующей статье ГФ РФ XIV, указано, что «при отсутствии фармакопейного стандартного образца можно использовать стандартный образец, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией одномерных спектров (применимо к олигопептидам до 20 аминокислотных остатков при естественном содержании изотопов ¹³C). Структурная интерпретация осуществляется с использованием двумерных методов корреляционной спектроскопии». Таким образом, ФЕАЭС допускает прямой способ идентификации строения действующего вещества при предпочтении косвенного способа.

Действующая редакция Ph. Eur. включает более широкий перечень ЛС, подлинность которых подтверждается методом ЯМР. В него входят:

- олиго- и полипептиды (как химический класс, так и индивидуальные соединения: бусерелин, гозерелин, гонадорелина ацетат, терлипрессин, октреотид)⁷;
- химические прекурсоры радиофармацевтических препаратов (как целевая группа⁸, так и индивидуальные соединения⁹);
- гепарины натрия и кальция различных молекулярных масс и лекарственных форм¹⁰;
- вакцины (конъюгированная вакцина гемофильная, тип В¹¹, конъюгированные вакцины менингококковых групп¹², конъюгированная вакцина полисахаридная пневмококковая¹³);
- ЛС животного происхождения (рыбий жир, лососевый жир)¹⁴;

- рекомбинантные белки¹⁵;
- индивидуальные низкомолекулярные соединения (например, тобрамицин¹⁶).

Согласно Ph. Eur., установление подлинности действующего вещества в ЛС методом ЯМР проводят косвенно, путем сопоставления спектров испытуемого и стандартного образцов¹⁷. Однако в Ph. Eur. предусмотрена возможность и прямого способа установления строения молекулы. Так, в разделе «Тесты идентификации» монографии «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»¹⁸ отмечено, что в отсутствие референсного стандарта может быть использован образец сравнения, идентичность которого должна быть подтверждена независимой структурной интерпретацией спектральных данных ЯМР или альтернативными методами.

В USP, в отличие от ГФ РФ, ФЕАЭС и Ph. Eur., прямой способ установления строения анализируемого соединения методом ЯМР регламентирован в отдельной монографии¹⁹. В ней отмечено, что информативность спектра ЯМР достаточна для вывода структур органических молекул даже при отсутствии референсных стандартов или их спектров. Относительно простые структуры могут быть идентифицированы с помощью химических сдвигов, мультиплетности спин-спинового взаимодействия и величин интенсивностей, полученных из одномерных спектров ¹H и ¹³C. Для расшифровки более сложных структур спектроскопистам рекомендуется получать

⁶ Проект ОФС 2.2.64 Спектрометрия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов. Фармакопея Евразийского экономического союза.

⁷ General monograph 2.2.64 Peptide identification by nuclear magnetic resonance. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020. Monograph 1077 Buserelin; Monograph 1636 Goserelin; Monograph 0827 Gonadorelin acetate; Monograph 12646 Terlipressin; Monograph 2414 Octreotide. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁸ Monograph 2902 Chemical precursors for radiopharmaceutical preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁹ Monograph 2350 Medronic acid for radiopharmaceutical preparations; Monograph 2294 Tetra-O-acetyl-mannose triflate for radiopharmaceutical preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹⁰ Monograph 0332 Heparin calcium; Monograph 0333 Heparin sodium; Monograph 0828 Heparins, low-molecular-mass; Monograph 1097 Enoxaparin sodium; Monograph 1134 Nadroparin calcium; Monograph 1252 Parnaparin sodium; Monograph 1271 Tinzaparin sodium European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹¹ Monograph 21219 Haemophilus type B conjugate vaccine. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹² Monograph 2112 Meningococcal group C conjugate vaccine; Monograph 262 Haemophilus type B and meningococcal group C conjugate vaccine; Monograph 3066 Meningococcal group A, C, W135 and Y conjugate vaccine. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹³ Monograph 2150 Pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (adsorbed). European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹⁴ Monograph 2398 Cod-liver oil, farmed; Monograph 1910 Salmon oil, farmed. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹⁵ Monograph 0784 Recombinant DNA technology, products of. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹⁶ Monograph 0645 Tobramycin. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹⁷ General Monograph 2.2.33 Nuclear magnetic resonance spectrometry. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

¹⁸ Там же.

¹⁹ General Monograph 1761 Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

двумерные спектры из экспериментов по определению гомо- или гетероядерных связей.

Действующая редакция USP также содержит ряд монографий, регламентирующих косвенное подтверждение методом ЯМР подлинности следующих ЛС:

- олигопептидов (гозерелина ацетат, окситоцин)²⁰;
- олиго- и полисахаридов (β -глюканы, фондапаринукс натрия)²¹;
- бактериальных полисахаридов, используемых при производстве вакцин²²;
- гепаринов натрия и кальция различных молекулярных масс и лекарственных форм, включая эноксапарин натрия и далтепарин натрия²³;
- вакцин (гликоконъюгированных, вакцин для человека)²⁴;
- смесей низкомолекулярных соединений²⁵;
- препаратов для перорального введения²⁶.

Также этот метод может использоваться для подтверждения подлинности незаявленных синтетических соединений в продуктах, реализуемых через коммерческую сеть как пищевые добавки²⁷.

Сравнительный анализ круга объектов, для которых отдельными ОФС, ФС и монографиями предусмотрено установление подлинности действующего вещества методом ЯМР, свидетельствует, что в USP он шире по сравнению с ГФ РФ XIV, ФEAЭС и Ph. Eur.

Следует подчеркнуть, что в USP регламентируется использование метода ЯМР для доказательства фальсификации биологически

активных добавок (БАД) и пищевых добавок растительного или животного происхождения²⁸. В этой монографии представлена процедура выявления фальсификатов. Предварительно регистрируют спектры наиболее распространенных синтетических наркотиков, снижающих аппетит, или синтетических стимуляторов потенции. Затем выявляют характерные для спектров этих веществ сигналы в спектрах БАД натурального происхождения, предназначенных для похудения или лечения эректильной дисфункции (их чаще всего фальсифицируют).

В JP прямая идентификация соединения превалирует над косвенной. Монография «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»²⁹ (раздел «Идентификация») первым пунктом предусматривает подтверждение подлинности на основе использования химических сдвигов, мультиплетности сигнала и его относительной интенсивности, и лишь вторым пунктом – идентификацию с использованием референсного стандарта. В соответствии с этой монографией образец может быть идентифицирован как заявленное вещество при условии, что экспериментально определенные величины химических сдвигов, мультиплетности и относительных интенсивностей сигналов совпадают со справочными значениями³⁰. В JP прямую идентификацию соединений методом ЯМР без использования СО активно используют при анализе природных ЛС, полученных из минералов, растений, органов, тканей, секретов и клеточных включений животных (данный вид ЛС в JP объединен термином «Crude drugs»). В частности, идентификацию биоактивных соединений

²⁰ Monograph 2150 Goserelin Acetate; Monograph 3366 Oxytocin. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²¹ Monograph 4808 Beta Glucan; Monograph 2029 Fondaparinux Sodium. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²² General Monograph 198 Nuclear magnetic resonance spectroscopy identity testing of bacterial polysaccharides used in vaccine manufacture. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²³ Monograph 2195 Heparin Sodium; Monograph 1230 Dalteparin Sodium; Monograph 1623 Enoxaparin Sodium. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²⁴ General Monograph 1234 Vaccines for human use—polysaccharide and glycoconjugate vaccines; General Monograph 1238 Vaccines for human use—bacterial vaccines. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²⁵ Monograph 331 Amyl Nitrite. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

Monograph 332 Amyl Nitrite Inhalant. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²⁶ General Chapter 2 Oral drug products—product quality tests. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²⁷ General Monograph 2251 Screening for undeclared drugs and drug analogues. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

²⁸ Там же.

²⁹ General Monograph 2.21 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

³⁰ Там же.

в природных ЛС проводят методом ЯМР, используя величины химических сдвигов сигналов, их мультиплетности и относительные интенсивности (тест 10 в ОФС «Тестирование природных ЛС»³¹). Выявляя сигналы биоактивных соединений в ЯМР-спектрах сложных смесей Crude Drugs, тем самым подтверждают подлинность этих природных ЛС. Метод ЯМР широко используется в фармацевтическом анализе в Японии, поскольку ЛС природного происхождения составляют значительный сегмент японского фармацевтического рынка.

В 47 частных монографиях JP предусматривает прямую идентификацию следующих синтетических ЛС без использования референсных стандартов³²: алпрозолам, азтреонам, карумонам натрия, цефаклор, цефадроксил, цефалексин, цефалотин натрия, цефатризин пропиленгликолат, цефазолин натрия, цефоперазон, цефкапен пивоксил гидрохлорид моногидрат, цефдинир, цефдиторен пивоксил, цефипим гидрохлорид гидрат, цефиксим гидрат, цефменоксим гидрохлорид, цефметазол натрия, цефминокс натрия гидрат, цефодизим натрия, цефоперазон натрия, цефотаксим натрия, цефотетан, цефотиам гексетил гидрохлорид, цефотиам гидрохлорид различных лекарственных форм, цефозопрам гидрохлорид различных лекарственных форм, цефпирамид натрия, цефпиром сульфат, цефподоксим проксетил, сефроксадин гидрат, цефсулодин натрия, цефтазидим различных лекарственных форм, цефтерам пивоксил, цефтибутен гидрат, цефтизоксим натрия, цефтриаксон натрия гидрат, цефуроксим аксетил, фломоксеф натрия, фосфомицин кальция гидрат, фосфомицин натрия, латамоксеф натрия, пиперацillin гидрат, рокитамицин, тазобактам, тобрамицин, трепибутон, воглибоза.

Суммарная информация по использованию метода ЯМР для установления подлинности

действующего вещества ЛС в различных фармакопеях мира представлена в таблице 1.

Таким образом, перечень ЛС, при контроле качества которых по показателю «подлинность» рекомендуется использовать метод ЯМР, в USP, Ph. Eur. и JP более широк по сравнению с отечественной фармакопеей и ФЕАЭС.

Определение абсолютного содержания действующего вещества лекарственного средства

Во всех анализируемых фармакопеях возможность определения абсолютного содержания действующего вещества декларируется в монографиях и ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»³³. При количественном анализе методом ЯМР определение абсолютного содержания действующего вещества в испытуемом образце ЛС осуществляют прямым измерением отношения интегральных интенсивностей сигналов действующего вещества и внутреннего стандарта. При отсутствии внутреннего стандарта содержание действующего вещества определяют как весовую долю в смеси установленных компонентов, суммируя при этом результаты прямого измерения относительной интегральной интенсивности сигналов каждого из компонентов ЛС. В USP возможность количественного определения абсолютного содержания анализируемого вещества в образце отражена в монографии, посвященной применению метода ЯМР в фармакопейном анализе³⁴. Следует отметить, что USP не только декларирует возможность использования ЯМР для оценки абсолютного содержания в общих монографиях, но и рекомендует этот способ в частных монографиях. Например, идентификацию и определение абсолютного содержания фосфолипидов в масле криля³⁵ осуществляют методом ЯМР на ядре ³¹P.

³¹ General Monograph 5.01 Crude Drugs Test. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

³² Official Monographs. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

³³ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

Проект ОФС 2.2.33 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Фармакопея Евразийского экономического союза.

General Monograph 2.2.33 Nuclear magnetic resonance spectrometry. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

General Monograph 761 Nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43-NF38. Rockville, MD; 2020.

General Monograph 2.21 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

³⁴ General Monograph 1761 Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43-NF38. Rockville, MD; 2020.

³⁵ Monograph 5100 Krill Oil; Monograph 5104 Krill Oil Capsules. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43-NF38. Rockville, MD; 2020.

Таблица 1. Использование метода ЯМР для установления подлинности действующего вещества лекарственного средства в различных фармакопеях мира

Table 1. The NMR method as used by different pharmacopoeias for active ingredient identification

Фармакопея <i>Pharmacopoeia</i>	Способ идентификации структуры лекарственного средства методом ЯМР <i>Method of the product structure identification by NMR</i>	Лекарственные средства, конкретизированные в монографиях <i>Medicines included in general and individual monographs</i>
ГФ РФ XIV <i>Ph. Rus. XIV</i>	Прямой и косвенный (предпочтительный) <i>Direct and indirect (preferred)</i>	Фармацевтические субстанции, пептиды как химический класс, полисахаридные вакцины <i>Active pharmaceutical ingredients, peptides as a chemical class, polysaccharide vaccines</i>
ФЕАЭС <i>Ph. EAEU</i>	Косвенный, прямой отмечен как возможный <i>Indirect method, with direct method included as an alternative</i>	Пептиды <i>Peptides</i>
Ph. Eur. 10.5	Косвенный, прямой отмечен как возможный <i>Indirect method, with direct method included as an alternative</i>	Химические прекурсоры для радиофармацевтических препаратов, пептиды (как химический класс, так и индивидуальные соединения), вакцины отдельных фармакологических групп, индивидуальные ЛС животного происхождения, рекомбинантные белки, индивидуальные низкомолекулярные соединения <i>Chemical precursors for radiopharmaceuticals, peptides (both as a chemical class and individual compounds), vaccines of individual pharmacological groups, individual medicines of animal origin, recombinant proteins, individual low molecular weight compounds</i>
USP43–NF38	Прямой и косвенный <i>Both direct and indirect</i>	Индивидуальные пептиды, индивидуальные олиго- и полисахариды, индивидуальные смеси низкомолекулярных соединений, бактериальные полисахариды как класс, вакцины отдельных фармакологических групп, гепарины, препараты для перорального введения, БАДы растительного и животного происхождения <i>Individual peptides, individual oligo- and polysaccharides, individual mixtures of low molecular weight compounds, bacterial polysaccharides as a class, vaccines of individual pharmacological groups, heparins, oral dosage forms, dietary supplements of plant and animal origin</i>
JP XVII	Прямой (предпочтительный) и косвенный <i>Direct (preferred) and indirect</i>	ЛС, полученные из минералов, растений, органов, тканей, секретов и клеточных включений животных, биоактивные вещества, входящие в состав ЛС природного происхождения, индивидуальные синтетические соединения <i>Medicinal products derived from minerals, plants, organs, tissues, secretions and cellular inclusions of animals, bioactive substances in medicines of natural origin, individual synthetic compounds</i>

Примечание. ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея XIV изд.; ФЕАЭС – Фармакопея Евразийского экономического союза; Ph. Eur 10.5 – Европейская фармакопея, версия 10.5; USP43–NF38 – Фармакопея США 43 изд., национальный формуляр 38; JP XVII – Японская фармакопея XVII изд.

Note. Ph. Rus. XIV–State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.; Ph. EAEU–Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union; Ph. Eur. 10.5–European Pharmacopoeia, 10.5; USP43–NF38–United States Pharmacopoeia 43rd ed., National Formulary 38th ed.; JP XVII–Japanese Pharmacopoeia, 17th ed.

В JP принципы количественной ЯМР-спектроскопии изложены в соответствующих монографиях³⁶. Кроме того, существует частная монография «Аналитические методики количественного определения методом ЯМР и их применение

к реагентам в японской фармакопее»³⁷, в которой декларируется использование метода ЯМР для определения степени чистоты маркерных соединений (биоактивных веществ ЛС группы Crude drugs), подпадающих под категорию

³⁶ General Monograph 2.21 Nuclear magnetic resonance spectroscopy; General Monograph 5.01 Crude Drugs Test. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

³⁷ Monograph Quantitative analytical technique utilizing nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and its application to reagents. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

«реагенты»³⁸. В JP³⁹ отмечено, что «применение количественной ЯМР-спектроскопии позволяет решить вопрос о чистоте реагентов, полученных из природного источника. Эти реагенты используются в качестве эталонных веществ с метрологической прослеживаемостью, когда точное содержание этих реагентов определяется метрологически с помощью количественного ЯМР». В JP метод ЯМР рекомендуется использовать и для определения абсолютного содержания индивидуальных соединений, например Е-коричной кислоты, генипоза, 6-гингерола, магнфлорина иодида, магнолола, логанина, пaeонола, рейна, розмариновой кислоты, салкасапина b2, 6-шогаола⁴⁰.

В ГФ РФ XIV, Ph. Eur. и ФЕАЭС, в отличие от JP и USP, отсутствуют общие или частные ФС, которые конкретизировали бы перечень ЛС, абсолютное содержание действующего вещества в которых может быть определено методом ЯМР.

Определение состава соединений нестехиометрического строения и средней длины полимерной цепи в полимерах и сополимерах

В настоящее время в медицинской практике активно применяют ЛС на основе соединений нестехиометрического состава. Как правило, это природные или модифицированные олиго- и полимеры, а также синтетические сополимеры, в которых могут варьировать мольные доли различных структурных фрагментов. Фармакокинетические свойства полимеров и сополимеров зависят от длины полимерной цепи и от соотношения структурных фрагментов макромолекулы, влияющих на его свойства [1–4]. Например, фармакокинетические свойства гидроксипропилкрахмалов (ГЭК), используемых в качестве плазмозаменителей, зависят от молекулярной массы этих модифицированных полимеров и от содержания

гидроксиэтильных групп в макромолекулах ГЭК. Гидроксиэтилирование замедляет процесс ферментного гидролиза ГЭК, продлевая тем самым время циркуляции препарата в кровотоке [5, 6]. Поэтому при проведении экспертизы качества полимеров и сополимеров актуально оценивать их нестехиометрический состав. Как правило, такой анализ выполняют хроматографическими методами, предварительно проведя деструкцию образца. Метод ЯМР является абсолютным и прямым методом измерения мольного соотношения структурных компонентов макромолекул, так как отношение интенсивностей сигналов этих компонентов равно отношению их молей. Зная мольный состав соединений, можно рассчитать число мономерных звеньев, то есть определить среднюю длину полимерной цепи. Поэтому в Ph. Eur. и USP метод ЯМР используют для определения мольного состава соединений нестехиометрического строения (табл. 2).

В ГФ РФ XIV, JP и ФЕАЭС отсутствуют общие или частные ФС, содержащие методики определения нестехиометрического состава конкретных сополимеров или модифицированных полимеров методом ЯМР.

Идентификация и количественное определение содержания примесей в лекарственных средствах

Возможность идентификации и количественного определения примесей методом ЯМР отражена в ОФС и монографиях «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» отечественной и зарубежных фармакопей⁴¹. Так, в ОФС ГФ РФ XIV отмечено, что «идентификацию посторонних примесей осуществляют аналогично установлению подлинности ЛС, ужесточая требования к чувствительности и цифровому разрешению. Метод ЯМР является абсолютным методом определения мольного соотношения ЛС и примесного соединения:

³⁸ General Monograph 9.41 Reagents, test solution. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

³⁹ Monograph Quantitative analytical technique utilizing nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and its application to reagents. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

⁴⁰ General Monograph 9.41 Reagents, test solution. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

⁴¹ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

Проект ОФС 2.2.33 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

General Monograph 2.2.33 Nuclear magnetic resonance spectrometry. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

General Monograph 761 Nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

General Monograph 2.21 Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

Таблица 2. Применение метода ЯМР для определения строения соединений нестехиометрического состава**Table 2.** The NMR method used for determination of the composition of non-stoichiometric compounds

Наименование ЛС <i>Product name</i>	Измеряемая величина <i>Measured value</i>	Фармакопея <i>Pharmacopoeia</i>
Гидроксипропилбетадекс ⁴² <i>Hydroxypropylbetadex</i> ⁴²	Степень молярного замещения (отношение числа гидроксипропильных фрагментов к числу глюкозидных звеньев) <i>Molar substitution degree (ratio of the number of hydroxypropyl fragments to the number of glucoside units)</i>	USP43–NF38; Ph. Eur. 10.5
Гидроксипропилкрахмалы (кукурузный, гороховый, картофельный) различных лекарственных форм ⁴³ <i>Hydroxypropyl starches (corn, pea, potato) in various dosage forms</i> ⁴³	Степень молярного замещения (отношение числа замещенных гидроксипропильных радикалом α-D-глюкопиранозных звеньев к их общему числу) <i>Molar substitution degree (the ratio of the number of α-D-glucopyranose units substituted with hydroxyethyl radical to the total number of α-D-glucopyranose units)</i>	USP43–NF38; Ph. Eur. 10.5
Хитозаны ⁴⁴ <i>Chitosans</i> ⁴⁴	Степень деацетилирования (отношение количества глюкозаминных фрагментов к общему числу мономерных звеньев в молекуле полисахарида) <i>Deacetylation degree (the ratio of the number of glucosamine fragments to the total number of monomeric units in the polysaccharide molecule)</i>	USP43–NF38
β-Глюканы ⁴⁵ <i>β-Glucans</i> ⁴⁵	Доля глюкопиранозных остатков с (1→6) гликозидными связями относительно общего числа глюкопиранозных звеньев <i>The proportion of glucopyranose residues with (1→6) glycosidic bonds relative to the total number of glucopyranose units</i>	USP43–NF38
Эфир полиоксиэтиленгликоля и олеиновой кислоты ⁴⁶ <i>Polyoxyethylene glycol and oleic acid ether</i> ⁴⁶	Средняя длина полимерной цепи <i>Average length of the polymer chain</i>	USP43–NF38
Эфир полиоксиэтиленгликоля и цетостеариновой кислоты ⁴⁷ <i>Polyoxyethylene glycol and Cetostearyl acid ester</i> ⁴⁷	Средняя длина полимерной цепи <i>Average length of the polymer chain</i>	USP43–NF38
Сульфобутилбетадекс натрия ⁴⁸ <i>Sulfobutylbetadex sodium</i> ⁴⁸	Степень молярного замещения (отношение числа сульфобутильных фрагментов к числу глюкозидных звеньев) <i>Molar substitution degree (ratio of the number of sulfobutyl fragments to the number of glucoside units)</i>	Ph. Eur. 10.5
Полоксамеры ⁴⁹ <i>Poloxamers</i> ⁴⁹	Отношение оксипропилен:оксиэтилен <i>Oxypropylene:oxyethylene ratio</i>	Ph. Eur. 10.5
Лауромакрогол ⁵⁰ <i>Lauromacrogol</i> ⁵⁰	Средняя длина полимерной цепи <i>Average length of the polymer chain</i>	Ph. Eur. 10.5

Примечание. Ph. Eur. 10.5 – Европейская фармакопея, версия 10.5; USP43–NF38 – Фармакопея США 43 изд., национальный формуляр 38.

Note. Ph. Eur. 10.5–European Pharmacopoeia, 10.5 ed.; USP43–NF38–United States Pharmacopoeia 43rd ed., National Formulary 38th ed.

⁴² Monograph 5818 Hydroxypropyl Betadex. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.
Monograph 1804 Hydroxypropylbetadex. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁴³ Monograph 6060 Hydroxypropyl Potato Starch, Monograph 6054 Hydroxypropyl Pea Starch, Monograph 6060 Hydroxypropyl Corn Starch, Monograph 6061 Pregelatinized Hydroxypropyl Potato Starch, Monograph 6056 Pregelatinized Hydroxypropyl Pea Starch, Monograph 6047 Pregelatinized Hydroxypropyl Corn Starch, United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.
Monograph 2165 Starch, hydroxypropyl, Monograph 2645 Starch, hydroxypropyl, pregelatinised. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁴⁴ Monograph 5710 Chitosan. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁴⁵ Monograph 4808 Beta Glucan. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁴⁶ Monograph 5950 Polyoxyl 10 Oleyl Ether. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁴⁷ Monograph 5955 Polyoxyl 20 Cetostearyl Ether. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁴⁸ Monograph 2804 Sulfobutylbetadex sodium. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁴⁹ Monograph 1464 Poloxamers. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁵⁰ Monograph 2046 Lauromacrogol 400. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

$$(n_{\text{ЛС}}/n_{\text{примесь}}) : \frac{S'_{\text{ЛС}}}{S'_{\text{примесь}}} = \frac{n_{\text{ЛС}}}{n_{\text{примесь}}},$$

где $S'_{\text{ЛС}}$ и $S'_{\text{примесь}}$ — нормированные значения интегральных интенсивностей ЛС и примеси⁵¹.

В области применения метода ЯМР для идентификации и определения количественного содержания примесей лидирует USP. Например, одна из монографий USP⁵² предусматривает использование метода ЯМР наряду с жидкостной хромато-масс-спектрометрией для идентификации всех органических контаминантов, экстрагируемых в ЛС из упаковок и систем доставки.

Ph. Eur. содержит частные монографии, рекомендуемые использовать метод ЯМР на различных ядрах для оценки содержания примесей в конкретных ЛС. Например, примесь В (трифторметансульфокислота) в тетра-О-ацетилманнозы трифлате идентифицируют и количественно оценивают⁵³ с помощью ЯМР на ядрах ¹⁹F, а идентификацию и количественное определение содержания примеси А (триизопропилфосфита) и В (тетраизопропилметилендифосфоната) в медроновой кислоте⁵⁴ проводят методом ¹H ЯМР.

Особое внимание в фармакопейном анализе уделяют идентификации и количественному определению токсичных примесей. Одно из основных требований к методу контроля таких примесей — его специфичность, то есть способность идентифицировать примесь в присутствии основных и вспомогательных компонентов ЛС. Метод ЯМР относится к самым специфичным методам идентификации соединений, поэтому он применим в тех случаях, когда не могут быть использованы хроматографические методы. Характерный пример — идентификация и количественное определение генотоксичной примеси гепарина — гиперсульфатированного хондроитинсульфата.

Лечение гепарином обычно хорошо переносится пациентами [7]. Однако в начале 2008 г. появились сообщения из США и европейских стран о серьезных нежелательных явлениях (вплоть до летального исхода) после внутривенного введения нефракционированного гепарина⁵⁵. Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) инициировало обширное расследование причин реакций пациентов. В феврале 2008 г. в клинически подозрительных партиях гепарина методами ЯМР и капиллярного электрофореза было выявлено присутствие неидентифицированного токсиканта, что нельзя было обнаружить с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Методы ЯМР и капиллярного электрофореза были немедленно введены FDA для скрининга на загрязнение всех партий гепарина⁵⁶. Была проведена идентификация структуры токсичной примеси, вызывающей тяжелый побочный эффект при применении инъекционных препаратов гепарина [8, 9]. USP и Ph. Eur. объявили о немедленном пересмотре своих монографий для гепарина натрия и включении в них метода ЯМР.

В настоящее время в соответствии с рекомендациями Ph. Eur. идентификацию гепарина, а также его нетоксичной примеси (дерматана сульфата) и оценку ее содержания относительно действующего вещества осуществляют методом ЯМР, в то время как отсутствие токсичной примеси (гиперсульфатированного хондроитина сульфата) устанавливают методом ВЭЖХ⁵⁷. В JP, напротив, отсутствие гиперсульфатированного хондроитина сульфата подтверждают методом ЯМР, а идентификацию гепарина и дерматана сульфата — методом ВЭЖХ⁵⁸. В USP метод ЯМР используют в обоих случаях⁵⁹. Проект ФС «Гепарин натрия»

⁵¹ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁵² General Monograph 1663 Assessment of extractables associated with pharmaceutical packaging/delivery systems. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁵³ Monograph 2294 Tetra-O-acetyl-mannose triflate for radiopharmaceutical preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁵⁴ Monograph 2350 Medronic acid for radiopharmaceutical preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁵⁵ Contaminant detected in heparin material of specified origin in the USA and in Germany. Geneva: WHO; 2008.

⁵⁶ Information on Heparin. Rockville, MD: FDA; 2008.

⁵⁷ Monograph 0332 Heparin calcium; Monograph 0333 Heparin sodium; Monograph 0828 Heparins, low-molecular-mass; Monograph 1097 Enoxoparin sodium; Monograph 1134 Nadroparin calcium; Monograph 1252 Parnaparin sodium; Monograph 1271 Tinzaparin sodium. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁵⁸ Monograph Heparin Calcium; Monograph Heparin Sodium. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

⁵⁹ Monograph 2195 Heparin Sodium; Monograph 1230 Dalteparin Sodium; Monograph 1623 Enoxaparin Sodium. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

отечественной фармакопеи, который находится на стадии утверждения, также предусматривает использование метода ЯМР как для подтверждения подлинности гепарина, так и для подтверждения отсутствия гиперсульфатированного хондроитин сульфата.

Оценка кристалличности и полиморфизма твердых лекарственных средств

Кристаллическое состояние — это устойчивое фазовое состояние твердого вещества, структура которого обладает пространственной трехмерной периодичностью в расположении молекул⁶⁰. Строгая трехмерная повторяемость в расположении молекул, распространяющаяся на бесконечное число периодов, называется кристаллической решеткой. Твердые кристаллические вещества, имеющие кристаллическую решетку без пространственных дефектов, обладают 100% кристаллическостью. Количественной характеристикой кристалличности является степень кристалличности — отношение массы кристаллической части порошка испытуемой субстанции к ее общей массе, выраженное в процентах или долях⁶¹. Вещества с нулевой кристаллическостью являются аморфными. Аморфные вещества характеризуются беспорядочным расположением молекул и не имеют постоянной температуры плавления. Кристаллическое вещество может обладать полиморфизмом — способностью существовать в различных кристаллических формах при одинаковом химическом составе. Такие формы называются полиморфными модификациями. Полиморфные модификации часто обладают различной биодоступностью и, как следствие, различной биологической активностью [10–12]. Степень кристалличности является одним из важных показателей, определяющих качество ЛС в твердых лекарственных формах. Изменение кристаллического состояния в значительной степени оказывает влияние на физико-химические, фармако-технологические свойства и биодоступность ЛС [13]. Оценка полиморфизма также обязательна в тех случаях, когда полиморфная модификация определяет терапевтическую эффективность и безопасность ЛС.

Для изучения кристалличности и полиморфизма используется особая разновидность метода ЯМР — твердофазная. В ГФ РФ XIV возможность изучения полиморфизма ЛС в твердом состоянии этим методом задекларирована в ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» и «Полиморфизм»⁶². При этом ОФС «Кристалличность» не указывает метод твердофазной ЯМР в перечне методов, применяющихся для определения степени кристалличности ЛС⁶³.

В ФЕАЭС твердофазную ЯМР рекомендуют в качестве метода мониторинга и определения кристалличности и полиморфизма⁶⁴. В монографии «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» Ph. Eur.⁶⁵ отмечено, что ЯМР веществ в твердом состоянии может быть использован для получения информации о полиморфизме и родственных молекулярных конформациях. Формулировка «информация о родственных молекулярных конформациях» подразумевает идентификацию методом твердофазной ЯМР конформационного полиморфизма — разновидности полиморфизма, при котором молекулы имеют не только различное расположение, но и различную конформацию [14–17].

Ph. Eur., аналогично ГФ РФ и ФЕАЭС, содержит монографии «Полиморфизм» и «Кристалличность»⁶⁶, в которых рекомендовано использовать твердотельную ЯМР не только для получения информации о полиморфизме и связанных с ним относительных молекулярных конформациях, но и в качестве одного из физико-химических методов изучения кристалличности.

Следует отметить, что монография «Кристалличность» USP⁶⁷ рекомендует использовать для оценки кристалличности твердого вещества исключительно метод оптической микроскопии, метод твердотельной ЯМР не упоминается.

В JP наличие кристаллического полиморфизма отмечается в частных монографиях на многие ЛС в твердом состоянии, например аторвастатин кальция гидрат, ауранофин, азелдинипин, беканамидин сульфат, цилексетил, клопидогрел

⁶⁰ ОФС.1.1.0018.15 Кристалличность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁶¹ Зоркий П.М. Симметрия молекул и кристаллических структур. М.: МГУ; 1986.

⁶² ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса; ОФС.1.1.0017.15 Полиморфизм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁶³ ОФС.1.1.0018.15 Кристалличность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁶⁴ Проект ОФС 2.3.8.0 Кристалличность; Проект ОФС 2.3.4.0 Полиморфизм. Фармакопея Евразийского экономического союза.

⁶⁵ General Monograph 2.2.33 Nuclear magnetic resonance spectrometry. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁶⁶ General Monograph 5.9 Polymorphism; General Monograph 5.16 Crystallinity. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

⁶⁷ General Monograph 655 Crystallinity. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

сульфат, дексаметазон, телмисартан и др.⁶⁸ Основным методом оценки степени кристалличности и полиморфных превращений в ЯР является метод порошковой рентгенофазовой дифракции⁶⁹. Примеры использования твердотельной ЯМР для анализа кристалличности и полиморфизма в ЯР отсутствуют.

Аттестация фармакопейных стандартных образцов

Важнейшей проблемой государственного контроля качества ЛС является обеспечение лабораторий стандартными образцами (СО) состава и свойств веществ и материалов. СО – это образец материала (вещества), достаточно однородный и стабильный по отношению к одному или нескольким определенным свойствам, которые были установлены, чтобы он был пригодным для предполагаемого использования в измерительном процессе⁷⁰. Свойства могут быть количественными или качественными (например, идентичность веществ или образцов). В настоящее время Международная организация законодательной метрологии (International Organization of Legal Metrology, OIML), Международная организация по стандартизации (International Organization for Standardization, ISO), Организации Метрической конвенции: Международный комитет мер и весов (Comité International des Poids et Mesures, CIPM) и Международное бюро мер и весов (Bureau International des Poids et Mesures, BIPM) выделяют СО в качестве самостоятельных «измерительных эталонов»⁷¹. Они играют ключевую роль в обеспечении качества на протяжении всего жизненного цикла ЛС, начиная от его разработки и заканчивая контролем качества.

Все СО подлежат аттестации – исследованию, направленному на установление значимых аттестованных характеристик в соответствии с программой или методикой испытаний, с последующим оформлением надлежащих

документов. К основным разделам испытаний первичных СО относятся структурное описание вещества с помощью подходящих химических характеристик (структурная формула, эмпирическая формула, молекулярная масса) и определение чистоты.

Метод ЯМР является прямым методом установления структуры и количественных измерений, поэтому его можно эффективно использовать для структурного описания и определения чистоты при аттестации свойств СО [18]. Круг влияющих величин, повышающих неопределенность результата измерения методом ЯМР, резко сужен по сравнению с методами, традиционно используемыми при установлении аттестованного значения СО (титрометрического, гравиметрического, хроматографического). В большинстве случаев он не требует установления и демонстрации прослеживаемости результатов измерений и контроля факторов, связанных со взвешиванием проб; чистотой реактивов, градуировкой, калибровкой средств измерений, калибровкой (поверкой) мерной посуды.

Все ведущие фармакопеи мира содержат фармакопейные статьи и монографии «Стандартные образцы»⁷², при этом в отечественной, Европейской фармакопеях и проекте Фармакопеи ЕАЭС в разделе «Аттестация СО» метод ЯМР указан первым пунктом в списке методов, рекомендуемых для структурного описания первичных СО. Абсолютными методами определения чистоты химических первичных СО в ГФ РФ XIV указаны дифференциальная сканирующая калориметрия или фазовая растворимость; содержание основного компонента в стандартном образце рекомендовано определять по принципу материального баланса. В то же время подлинность и чистоту биологических СО рекомендуется подтверждать физико-химическими методами, среди которых на первом месте стоит метод ЯМР.

В ФЕАЭС рекомендуется определение чистоты СО проводить прямыми количественными

⁶⁸ Official Monographs. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

⁶⁹ General Monograph 2.58 X-Ray Powder Diffraction Method. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

⁷⁰ ГОСТ 8.315-2019. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. М.: Стандартинформ; 2019.

⁷¹ РМГ 72-2007. Оценка измерительных возможностей национальных органов по метрологии на основе метрологических характеристик стандартных образцов состава и свойств веществ и материалов. М.: Стандартинформ; 2009.

⁷² ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

Проект ОФС 5.12 Стандартные образцы. Фармакопея Евразийского экономического союза.

General monograph 5.12 Reference standards. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2020.

General monograph G9 Reference standards. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

General Monograph 11 USP reference standards. United States Pharmacopoeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

методами, в том числе методом ЯМР⁷³. В JP, аналогично ФЕАЭС, структурное описание СО и определение их чистоты предлагается осуществлять прямым способом с помощью метода ЯМР⁷⁴. В USP в монографии «Стандартные образцы»⁷⁵ определение чистоты СО рекомендуется проводить с помощью процедуры определения баланса массы. Следует отметить, что данная монография не содержит информацию об использовании метода ЯМР для структурного описания СО. В то же время в монографии «Применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса»⁷⁶ указано, что этот метод является прямым методом определения строения и чистоты образца.

Таким образом, все ведущие фармакопеи декларируют применение метода ЯМР для решения широкого круга задач фармакопейного анализа. Суммарный перечень показателей качества ЛС, которые оценивают методом ЯМР, представлен в таблице 3.

Наблюдается гармонизация ГФ РФ XIV, ФЕАЭС и Ph. Eur. в этой области, хотя Ph. Eur. содержит большее число монографий, конкретизирующих применение метода ЯМР. Следует отметить положительную динамику внедрения метода ЯМР в отечественную фармакопейную практику. Так, до 2015 г. ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»⁷⁷ была единственной общей фармакопейной статьей отечественной фармакопеи, предусматривающей применение метода ЯМР в фармакопейном анализе. В 2015 г. в отечественную фармакопею были добавлены ОФС «Метод ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин», «Фармацевтические субстанции», «Полиморфизм»⁷⁸, конкретизирующие применение метода ЯМР. В 2018 г. в ГФ РФ были включены ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов» и «Стандартные образцы»⁷⁹. В настоящее время на стадии утверждения находятся еще три фармакопейные статьи, рекомендуемые использовать метод ЯМР для решения

конкретных задач фармакопейного анализа. При этом положительная динамика внедрения метода ЯМР в отечественную фармакопею менее выражена по сравнению с Ph. Eur. Например, число фармакопейных статей (общих и частных), предусматривающих использование метода ЯМР в фармацевтическом анализе, в Ph. Eur. 9.6 и Ph. Eur. 10.5 составляет 26 и 41 соответственно.

Экспертная практика ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России показывает, что целый ряд отечественных производителей включает в нормативную документацию метод ЯМР для оценки показателей качества своей продукции. В первую очередь речь идет о подтверждении подлинности субстанций (например, тафалгин, даларгин, кумазин С) и СО (например, ГСО даларгина, СО имунофана, тимогена и доксорубицина гидрохлорида). Кроме того, методом ЯМР идентифицируют и количественно определяют примесь уксусной кислоты в субстанции даларгина, остаточные органические растворители в субстанции перхлорона, примесь N-ацетилантралиновой кислоты в субстанциях «Аллапинин» и «Лаппаконитина гидробромид». Это говорит о целесообразности с точки зрения производителей использовать метод ЯМР при контроле качества выпускаемой продукции.

При разработке новых ФС в ГФ РФ и ФЕАЭС можно использовать результаты деятельности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по внедрению метода ЯМР в фармакопейный анализ. В первую очередь это касается разработанных методик оценки показателей качества фармацевтических субстанций [19–25].

Выводы

На основе сравнительного анализа материалов национальных и международных фармакопей по использованию метода ЯМР при решении задач контроля качества ЛС можно сделать следующие выводы:

⁷³ Проект ОФС 5.12 Стандартные образцы. Фармакопея Евразийского экономического союза.

⁷⁴ General monograph G9 Reference standards. Japanese Pharmacopoeia. 17th ed. English version. Tokyo; 2016.

⁷⁵ General Monograph 11 USP reference standards. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁷⁶ General Monograph 1761 Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy. United States Pharmacopeia. 43rd ed. USP43–NF38. Rockville, MD; 2020.

⁷⁷ ОФС.1.2.1.1.0007.15 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁷⁸ ОФС.1.7.2.0014.15 Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин; ОФС.1.1.0006.15 Фармацевтические субстанции; ОФС.1.1.0017.15 Полиморфизм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁷⁹ ОФС.1.7.2.0036.18 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов; ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

Таблица 3. Показатели качества лекарственных средств, оцениваемые методом ЯМР при проведении фармакопейного анализа

Table 3. Medicinal product quality attributes evaluated by NMR in pharmacopoeial analysis

Показатель <i>Parameter</i>	ГФ РФ XIV <i>Ph. Rus. XIV</i>	ФЕАЭС <i>Ph. EAEU</i>	Ph.Eur. 10.5	USP43– NF38	JP XVII
Подтверждение подлинности действующего вещества <i>Identification of the active ingredient</i>	+	+	+	+	+
Определение абсолютного содержания действующего вещества <i>Determination of the absolute content of the active ingredient</i>	+	+	+	+	+
Определение состава соединений нестехиометрического строения <i>Determination of the composition of non-stoichiometric compounds</i>	–	–	+	+	–
Определение средней длины полимерной цепи в полимерах и блок-сополимерах <i>Determination of the average polymer chain length in polymers and block copolymers</i>	–	–	+	+	–
Идентификация и количественное определение примесей <i>Identification and quantification of impurities</i>	+	+	+	+	+
Оценка полиморфизма и кристалличности <i>Evaluation of polymorphism and crystallinity</i>	+	+	+	–	–
Аттестация СО <i>Certification of reference standards</i>	+	+	+	+	+

Примечание. ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея XIV изд.; ФЕАЭС – Фармакопея Евразийского экономического союза; Ph. Eur 10.5 – Европейская фармакопея, версия 10.5; USP43–NF38 – Фармакопея США 43 изд., национальный формуляр 38; JP XVII – Японская фармакопея XVII изд.

«+» – показатель оценивают методом ЯМР; «–» – показатель не оценивают методом ЯМР.

Note. Ph. Rus. XIV–State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.; Ph. EAEU–Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union; Ph. Eur 10.5–European Pharmacopoeia, 10.5 ed.; USP43–NF38–United States Pharmacopoeia, 43rd ed., National Formulary, 38th ed.; JP XVII–Japanese Pharmacopoeia, 17th ed.

+ attribute assessed by NMR; – attribute not assessed by NMR.

1) в области установления подлинности действующего вещества ЛС и определения его абсолютного содержания методом ЯМР лидируют Фармакопея США и Японская фармакопея, которые не только декларируют уникальные возможности этого метода напрямую устанавливать строение вещества и оценивать его содержание без использования стандартных образцов, но и рекомендуют использовать этот метод для широкого круга объектов;

2) в области определения состава соединений нестехиометрического строения и средней длины полимерной цепи в полимерах и сополимерах методом ЯМР ведущие позиции занимают Фармакопея США и Европейская фармакопея;

3) идентификация и количественное определение примесей методом ЯМР декларированы во всех изученных фармакопеях. Действующая редакция Фармакопеи США включает более широкий перечень контаминантов, определяемых в ЛС методом ЯМР, по сравнению с Европейской, Японской фармакопеями, а также Государственной фармакопеей Российской Федерации и Фармакопеей Евразийского экономического союза;

4) Государственная фармакопея Российской Федерации, Фармакопея Евразийского экономического союза и Европейская фармакопея

рекомендуют в качестве метода мониторинга и определения кристалличности и полиморфизма твердофазную ЯМР-спектроскопию – одну из разновидностей метода ЯМР;

5) Государственная фармакопея Российской Федерации, Фармакопея Евразийского экономического союза, Европейская и Японская фармакопеи рекомендуют использовать метод ЯМР при аттестации СО;

6) в Государственной фармакопее Российской Федерации наблюдается положительная динамика использования метода ЯМР для контроля качества ЛС;

7) в целях гармонизации отечественной фармакопеи с Фармакопеей Евразийского экономического союза и Европейской фармакопеей необходимо внести изменение в ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» ГФ РФ XIV, предусматривающее прямой способ установления строения анализируемого соединения методом ЯМР;

8) в целях гармонизации отечественной фармакопеи с Фармакопеей Евразийского экономического союза и Европейской фармакопеей необходимо внести изменение в ОФС «Стандартные образцы», включив в перечень абсолютных методов определения чистоты химических первичных СО метод ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shu C-H, 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.
- Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Paulsen BS, Wagner H. Immunologically active O6-branched (1 \rightarrow 3)- β -glucan from the lichen *Thamnoia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine.* 2003;10(4):318–24. <https://doi.org/10.1078/094471103322004811>
- 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>
- Cheng HN, Neiss TG. Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides. *Polym Rev.* 2012;52(2):81–114. <https://doi.org/10.1080/15583724.2012.668154>
- Westphal M, James MFM, Kozek-Langenecker S, Stocker R, Guidet B, Van Aken H. Hydroxyethyl starches: different products – different effects. *Anesthesiology.* 2009;111(1):187–202. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181a7ec82>
- Yuruk K, Almac E, Ince C. Hydroxyethyl starch solutions and their effect on the microcirculation and tissue oxygenation. *Transfus Altern Transfus Med.* 2007;3(9):164–72. <https://doi.org/10.1111/j.1778-428X.2007.00076.x>
- Lane DA, Lindahl U, eds. Heparin: chemical and biological properties. In: *Clinical applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989.
- Guerrini M, Becatti D, Shriver Z, Naggi A, Viswanathan K, Bisio A, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol.* 2008;26(6):669–75. <https://doi.org/10.1038/nbt1407>
- Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S, Pelzer K, et al. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med.* 2008;358(23):2457–67. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0803200>
- Censi R, Di Martino P. Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs. *Molecules.* 2015;20(10):18759–76. <https://doi.org/10.3390/molecules201018759>
- Singhal D, Curatolo W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(3):335–47. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.008>
- Zhou Y, Wang J, Xiao Y, Wang T, Huang X. The effects of polymorphism on physicochemical properties and pharmacodynamics of solid drugs. *Curr Pharm Des.* 2018;24(21):2375–82. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180515155425>
- Смирнова ИГ, Гильдеева ГН, Чистяков ВВ. Анализ кристаллической и пространственной структуры лекарственных веществ. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия.* 2012;53(4):234–40. [Smirnova IG, Gildeeva GN, Chistyakov VV. Analysis of crystalline structure and chirality of drug substances. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2: Khimiya = Moscow University Chemistry Bulletin.* 2012;53(4):234–40 (In Russ.)]
- Brittain HG, ed. *Polymorphism in pharmaceutical solids*. New York: Marcel Dekker; 1999.
- Desiraju GR. Supramolecular synthons in crystal engineering – a new organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1995;34(21):2311–27. <https://doi.org/10.1002/anie.199523111>
- Reddy DS, Ovchinnikov YE, Shishkin OV, Struchkov YT, Desiraju GR. Supramolecular synthons in crystal engineering. 3. Solid state architecture and synthon robustness in some 2,3-dicyano-5,6-dichloro-1,4-dialkoxybenzenes. *J Am Chem Soc.* 1996;118(17):4085–9. <https://doi.org/10.1021/ja953372u>
- Serezhkin VN, Serezhkina LB. New criterion for conformational polymorphism. *Crystallogr Rep.* 2012;57(1):33–42. <https://doi.org/10.1134/S1063774511030291>
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Яшкир ВА, Осинцева ЕВ. Возможности использования метода ядерного магнитного резонанса при аттестации стандартных образцов. *Стандартные образцы.* 2014;(2):19–25. [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Yashkir VA, Osintseva EV. The possibility of the nuclear magnetic resonance methods using for reference standards certification. *Standartnye obraztsy = Reference Materials.* 2014;(2):19–25 (In Russ.)]
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения молярного замещения гидроксипропила крахмала методом ^1H ЯМР-спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал.* 2016;50(4):47–51. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-4-47-51> [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of a method for measuring the molar substitution of hydroxyethylstarches by ^1H NMR Spectroscopy. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016;50(4):265–9] <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1435-9>
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Кутин АА, Жуков ЕА, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики определения аминокислотного состава фармацевтической субстанции «Глатирамера ацетат» методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2017;7(3):175–81. [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Kutin AA, Zhukov EA, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of the procedure for determination of amino acids composition of glatiramer acetate by C-13 NMR spectroscopy. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2017;7(3):175–81 (In Russ.)]
- 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. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-9-60-63> [Moiseev SV, Kuz'mina 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>
- Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Дерябин АС, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики подтверждения подлинности фармацевтической субстанции «Бусерелина ацетат» методом ЯМР-спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал.* 2018;52(2):48–53. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-2-48-53>

- doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-2-48-53 [Kuz'mina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Deryabin AS, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of an NMR-spectroscopic method for authenticity confirmation of busserelin acetate pharmaceutical substance. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(2):159–65] <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1783-8>
23. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Крылов ВИ, Яш-кир ВА, Меркулов ВА. Валидация методики количественного определения трифторацетатов в фармацевтической субстанции «глатирамера ацетат» методом ¹⁹F ЯМР-спектроскопии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(7):61–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-7-61-64> [Moiseev SV, Kuz'mina NE, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Validation of a method for assay of trifluoroacetates in the pharmaceutical substance glatiramer acetate by ¹⁹F NMR spectroscopy. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(7):658–62] <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1877-3>
24. Моисеев СВ, Кузьмина НЕ, Лутцева АИ. Разработка методик подтверждения подлинности фармацевтических субстанций трипторелина ацетат и гозерелина ацетат методом ЯМР-спектроскопии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(1):54–63. [Moiseev SV, Kuz'mina NE, Luttseva AI. Development of identification test methods for triptorelin acetate and goserelin acetate substances using NMR spectroscopy. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(1):54–63 (In Russ.)) <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-1-54-63>
25. Kuz'mina NE, Moiseev SV, Khorolskiy MD, Luttseva AI. Development and validation of 2-azaspiro [4,5] decan-3-one (impurity A) in gabapentin determination method using qNMR spectroscopy. *Molecules*. 2021;26(6):1656. <https://doi.org/10.3390/molecules26061656>

Вклад авторов. С.В. Моисеев — идея исследования, подбор и анализ литературы, редактирование текста; Н.Е. Кузьмина — идея исследования, планирование исследования, подбор и анализ литературы, написание и оформление текста рукописи; А.И. Лутцева — ответственность за все аспекты работы и целостность всех частей статьи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

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 «Ведомости 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. Sergey V. Moiseev—elaboration of the study idea, literature review, editing of the text; Natalia E. Kuz'mina—elaboration of the study idea, planning of the study, literature review, drafting and formatting of the paper; Anna I. Luttseva—carrying responsibility for all aspects of the study 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 a 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

Моисеев Сергей Владимирович, канд. хим. наук, доцент.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8752-5245>
Lutceva@expmed.ru

Sergey V. Moiseev, Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1310-4477>
MoiseevSV@expmed.ru

Natalia E. Kuz'mina, Dr. Sci. (Chem.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9133-0835>
KuzminaN@expmed.ru

Anna I. Luttseva, Cand. Sci. (Pharm.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8752-5245>
Lutceva@expmed.ru

Статья поступила 03.11.2021
После доработки 14.12.2021
Принята к печати 04.03.2022

Article was received 3 November 2021
Revised 14 December 2021
Accepted for publication 4 March 2022



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, антитоксическое 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 кровезаменителей [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 биодеградации 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, одностипности формы и невалентных взаимодействиях 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

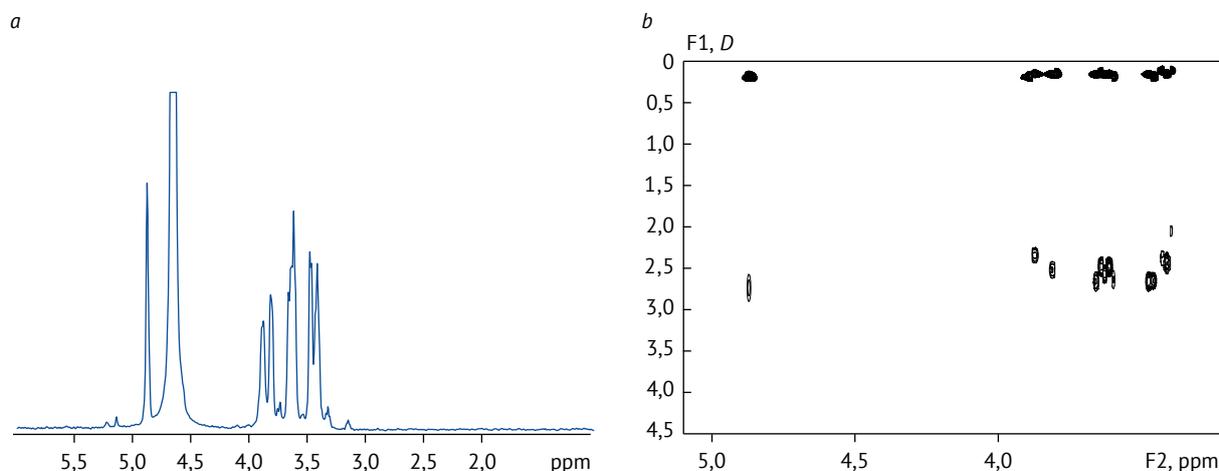


Рис. 1. Спектры ^1H (а) и DOSY (b) водного раствора смеси декстранов (молекулярные массы 1 и 670 кДа)

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 (микробиотических) 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-глюкопиранозида, 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 $\eta([\text{CD}])$. Для расчета $\eta([\text{CD}])$ была предложена следующая эмпирическая функция:

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

где $[\text{CD}]$ – 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 полимеризированных 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 шитой 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 образуемой 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 проницаемостью. 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 HMBBC). 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 *Acrospermum 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], гидроксипулуланов [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 < гидроксипулуланы (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 гидроксипропилоккрахмалы <i>Branched hydroxyethyl starches</i>

характеризующихся одинаковым типом невалентных взаимодействий и различной степенью ветвления, соответствуют различные молекулярные массы, причем значения MM убывают в ряду гидроксипропилоккрахмалы > 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.

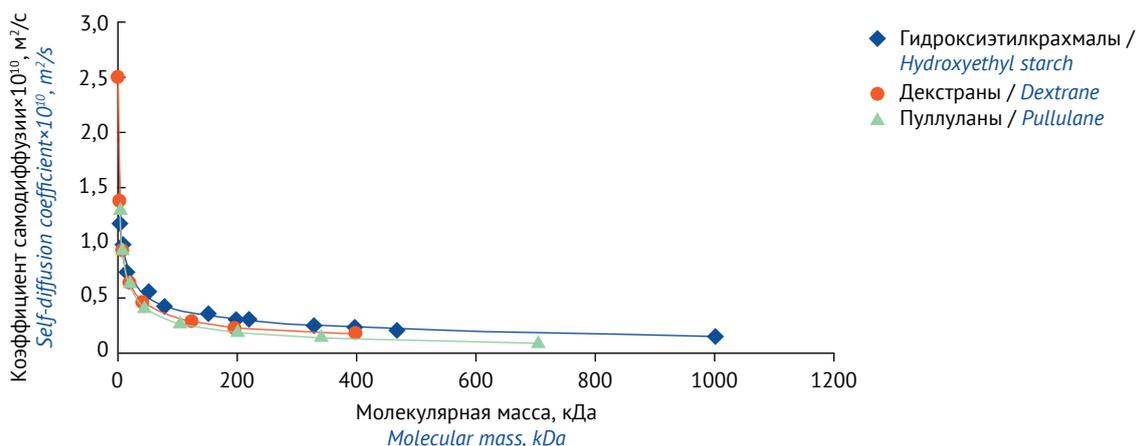


Рис. 2. Зависимости коэффициента самодиффузии от молекулярной массы для гидроксиэтилкрахмалов, декстранов и пуллуланов

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,

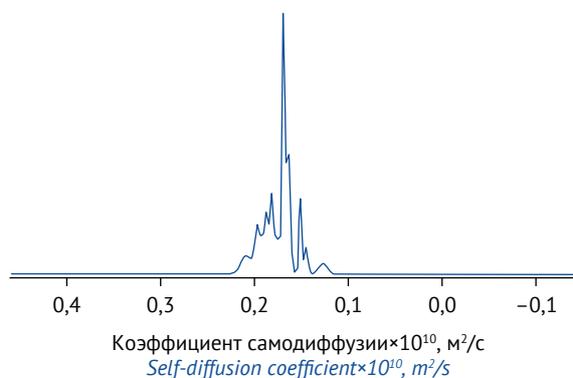


Рис. 3. Распределение величин коэффициента самодиффузии образца декстрана с молекулярной массой 670 кДа

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

величина D_s которого ($0,272 \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$) 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-

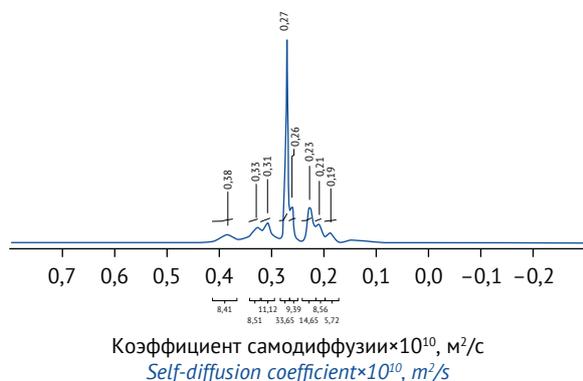


Рис. 4. Распределение коэффициентов самодиффузии образца гидроксиэтилкрахмала с молекулярной массой 459 кДа

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

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 гидродинамический радиус и уменьшается 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,

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:

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

где M_w – средневесовая молекулярная масса гидроксиэтилкрахмалов (кДа), MZ – степень молярного замещения, D_s – средний коэффициент самодиффузии (m^2/c).

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 antitumor 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, Ereemeev 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 гидроксипропилированного крахмала – современные и эффективные плазмозамещающие средства инфузионной терапии*. М.: ИЦССХ 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. [Oltarzhetskaya 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. Kostyuchenok 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, Бородкин 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, Durantón 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, Jimernez-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. Yamanoi 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. Frömring 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, Bosch F, Martel B, Azaroual N. Formation of cyclodextrin inclusion complexes with doxycycline-hydrate: 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, Popławska 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 Abeta(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, Khoukha 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):3884–94. <https://doi.org/10.1039/C8FO00690C>
48. Suárez ER, Syvitski R, Kralovec JA, Noseda 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, Kuz'mina 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, Kuz'mina 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, Kuz'mina 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 stimulatedecho 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, Kuz'mina 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 гидроксипропила крахмалов 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-farmatsevticheskij 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

Статья поступила 15.11.2021
После доработки 10.01.2022
Принята к печати 04.03.2022

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

Article was received 15 November 2021
Revised 10 January 2022
Accepted for publication 4 March 2022



С.В. Овсиенко 
В.М. Шукин  
Е.А. Блинкова 
Н.Е. Кузьмина 

Определение методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой содержания тяжелых металлов, мышьяка и алюминия в лекарственном растительном сырье «Тыквы семена» и нативных продуктах на его основе

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

✉ Шукин Виктор Михайлович; schukin@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Семена тыквы относятся к нативным продуктам. Их характерная особенность заключается в том, что они могут потребляться напрямую, без предварительной экстракции исходного сырья. Количество элементных токсикантов в исходном лекарственном сырье полностью соответствует таковому в нативном продукте. В связи с этим изучение особенностей накопления элементных токсикантов семенами тыквы является актуальным. **Цель работы** — определение содержания тяжелых металлов, As и Al в лекарственном растительном сырье и нативных продуктах «Семена тыквы» и оценка степени накопления этих элементов в зависимости от места произрастания. **Материалы и методы:** в качестве объектов исследования использовали нативные продукты «Семена тыквы» отечественных производителей, а также семена тыквы, собранные в местах с различной антропогенной нагрузкой. Пробоподготовку проводили методом микроволнового разложения, анализ содержания элементов — методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. **Результаты:** экспериментально установлено содержание эссенциальных, условно эссенциальных, потенциально токсичных и токсичных элементов в семенах тыквы. Проведен сравнительный анализ элементного состава семян тыквы и семян, зерен и бобов различных масличных, зерновых и зернобобовых сельскохозяйственных культур. **Выводы:** содержание нормируемых элементных токсикантов (As, Cd, Hg, Pb) в исследованных образцах лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов «Тыквы семена» не превышает норм, установленных отечественной фармакопеей. Ненормируемые токсичные элементы либо не присутствуют в семенах тыквы (Tl), либо присутствуют в незначительных количествах (Al). Содержание ряда эссенциальных элементов (Zn, Fe, Mn, Cu, Mo, Cr) в семенах тыквы выше, чем в семенах многих масличных культур. Место произрастания тыквы не оказывает существенного влияния на содержание исследованных элементов в семенах тыквы. В условиях сильного загрязнения окружающей среды семена тыквы способны накапливать аномально высокие количества Cd, Co и Ni.

Ключевые слова: семена тыквы; нативный продукт; тяжелые металлы; мышьяк; алюминий; масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой; ИСП-МС

Для цитирования: Овсиенко С.В., Шукин В.М., Блинкова Е.А., Кузьмина Н.Е. Определение методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой содержания тяжелых металлов, мышьяка и алюминия в лекарственном растительном сырье «Тыквы семена» и нативных продуктах на его основе. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(1):41–55. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-41-55>

S.V. Ovsienko 
V.M. Shchukin  
E.A. Blinkova 
N.E. Kuz'mina 

Determination of Heavy Metals, Arsenic, and Aluminum Content in Pumpkin Seed Herbal Substance and Native Products, by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

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

✉ **Victor M. Shchukin**; schukin@expmed.ru

ABSTRACT

Pumpkin seeds belong to the so-called native products. Their characteristic feature is that they can be consumed directly, without prior extraction of the starting material. All elemental toxicants contained in pumpkin seeds are transferred in full to the native product. Therefore, it is important to study specific aspects of elemental toxicant accumulation by pumpkin seeds. **The aim of the study** was to determine the content of heavy metals, As, and Al in pumpkin seed herbal substance and native products, and to assess the degree of accumulation of these elements, depending on the vegetation area. **Materials and methods:** the study evaluated pumpkin seed native products by Russian manufacturers as well as pumpkin seeds harvested in areas with different anthropogenic load. The sample preparation was performed by microwave digestion, and the determination of the elemental toxicants was performed by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Results:** the pumpkin seeds were shown to contain essential, probably essential, potentially toxic, and toxic elements. The authors performed comparative analysis of the elemental composition of pumpkin seeds as well as seeds, grains, and beans of various oil-bearing, grain, and leguminous crops. **Conclusions:** the content of the specified elemental toxicants (As, Cd, Hg, Pb) in the tested samples of pumpkin seed herbal substance and herbal medicinal products did not exceed the limits established by the Russian Pharmacopoeia. The unspecified toxic elements were either absent in pumpkin seeds (Tl) or found in trace amounts (Al). The content of a number of essential elements (Zn, Fe, Mn, Cu, Mo, Cr) in pumpkin seeds was higher than in the seeds of many oil-bearing crops. The vegetation area had no significant influence on the content of the tested elements in the pumpkin seeds. Pumpkin seeds are capable of accumulating abnormally high amounts of Cd, Co, and Ni in areas with high environmental pollution.

Key words: pumpkin seeds; native product; heavy metals; arsenic; aluminum; inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS

For citation: Ovsienko S.V., Shchukin V.M., Blinkova E.A., Kuz'mina N.E. Determination of heavy metals, arsenic, and aluminum content in pumpkin seed herbal substance and native products, by inductively coupled plasma mass spectrometry. *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):41–55. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-41-55>

Введение

Одним из основных показателей качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП) является содержание в них элементов-токсикантов (ЭТ), которое строго нормируется. В настоящее время необходима корректировка существующих норм содержания ЭТ в ЛРС и ЛРП из-за изменений в нормативной и методологической

документации. Так, в Государственной фармакопее Российской Федерации, Европейской фармакопее и Фармакопее США изменен принцип нормирования содержания тяжелых металлов (ТМ) и мышьяка (As) в ЛРС и ЛРП с суммарного на селективный [1]. Полуколичественный калориметрический метод элементного анализа заменен на количественные спектральные методы: масс-спектрометрию с индуктивно связанной

плазмой (ИСП-МС)¹, атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС)² и атомно-абсорбционную спектрометрию (ААС)³. Изменен метод извлечения элементов из органической матрицы: с метода разложения в открытых сосудах, который ведет к частичной потере летучих элементов, на метод разложения в закрытых сосудах. Кроме того, необходимость корректировки обусловлена тенденцией обоснования норм содержания As и Tm в лекарственных препаратах (в частности нативных ЛРП) суточной нормой потребления элемента, а не величиной его предельной допустимой концентрации (ПДК)⁴.

Переход от ПДК к суточной дозе потребления ведет к необходимости оценки степени перехода ЭТ из ЛРС в ЛРП, которая зависит от способа переработки ЛРС. Особую категорию ЛРП составляют нативные продукты на основе ЛРС, которые не содержат никаких вспомогательных веществ⁵. Характерная особенность нативных ЛРП заключается в том, что они потребляются напрямую, без какой-либо предварительной экстракции (водной, спиртовой или масляной). Как следствие, при их употреблении все элементы-токсиканты, содержащиеся в исходном ЛРС, переходят в организм человека. Данная особенность нативных продуктов диктует необходимость нормировать содержание в них элементных токсикантов по аналогии с синтетическими лекарственными препаратами.

В России наиболее распространенными нативными продуктами на основе ЛРС являются слоевища ламинарии, семена льна посевного и семена тыквы⁶. Слоевища ламинарии и семена льна широко изучены, требования к содержанию ЭТ в них отражены в соответствующих фармакопейных статьях. Известно, что слоевища ламинарии обладают уникальной способностью накапливать Cd и As в его нетоксичной органической форме, поэтому для ламинарии установлены индивидуальные нормы содержания As (90 мг/кг вместо 0,5 мг/кг⁷ [2]) и Cd (4 мг/кг вместо 1 мг/кг⁸). В Европейской фармакопее также установлена индивидуальная норма по содержанию Cd в семенах льна (0,5 ppm вместо 1 ppm)⁹, при этом в последнее время нормы по содержанию данного элемента в Европе ужесточаются¹⁰. В отличие от других нативных продуктов на основе ЛРС, в отношении семян тыквы не проводилось систематических исследований по особенностям накопления в них ЭТ.

Семена тыквы и продукты их переработки оказывают противоязвенное, гепатопротекторное, желчегонное действие и обладают противогельминтной активностью¹¹ [3–6]. Их применяют при гепатите, жировой дистрофии печени, холецистохолангите, дискинезии желчевыводящих путей, гастрите, изжоге, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, колите, энтероколите, геморрое,

¹ ОФС.1.5.3.0009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

ОФС.2.4.27. Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза. General Monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. Supplement 10.5. 10th ed. Strasbourg; 2019.

Elemental impurities—procedures. General chapters 233. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

² Elemental impurities—procedures. General chapters 233. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

³ General Monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. Supplement 10.5. 10th ed. Strasbourg; 2019.

ОФС.1.5.3.0009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

ОФС.2.4.27. Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза.

⁴ Q3D(R2) Guideline for elemental impurities, 2020.

⁵ Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2018 № 6 «Руководство по качеству лекарственных растительных препаратов».

⁶ ФС.2.5.0026.15. Льна посевного семена; ФС.2.5.0080.18. Ламинарии слоевища (морская капуста); ФС.2.5.0100.18. Тыквы семена. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁷ ФС.2.5.0080.18. Ламинарии слоевища (морская капуста). Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 4. М.; 2018. Monograph 01/2008:1426 Kelp. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

⁸ Monograph 01/2008:1426 Kelp. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

⁹ Monograph 04/2011:0095 Linseed. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

¹⁰ Commission regulation (EU) 2021/1323 of 10 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in certain foodstuffs.

¹¹ European Medicines agency. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) 2012. Assessment report on *Cucurbita pepo* L., semen.

атеросклерозе, простатите, доброкачественной гиперплазии предстательной железы, эрозии шейки матки, а также для лечения герпеса, дерматита, диатеза, псориаза, экземы, ожогов и пародонтоза [6–9]. Имеются данные о заметном противовоспалительном и анальгетическом действии производных семян тыквы [10], а также об их положительном эффекте при сахарном диабете 2-го типа и андрогенной алопеции [11]. Поэтому актуально изучение особенностей накопления ЭТ в данном виде нативных растительных продуктов.

Цель работы – определение содержания тяжелых металлов, As и Al в лекарственном растительном сырье и нативных продуктах «Тыквы семена» и оценка степени накопления этих элементов в зависимости от места произрастания.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали нативные продукты «Семена тыквы» производства ООО «Здоровье» и ООО «Беловодье», а также семена тыквы, собранные в местах с различной антропогенной нагрузкой в 2021 г.: г. Кубинка, г. Красногорск, г. Звенигород, г. Жуковский, с. Абрамцево, с. Конобеево, д. Холдеево (Московская обл.), с. Кемля, с. Ичалки, с. Первомайск, с. Инелей (Мордовия), д. Липово (Чувашская Респ.), с. Староюрьево (Тамбовская обл.). В круг определяемых элементов включили эссенциальные (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Cr, Co, Se), условно эссенциальные (As, Ni, V) и токсичные (Al, Cd, Hg, Pb, Sr, Tl) элементы. Al был включен в список определяемых элементов, так как он обладает схожими с тяжелыми металлами токсичными свойствами [12].

Извлечение ЭТ из органической матрицы тыквы проводилось путем микроволновой минерализации по методике, разработанной в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [13]. Для установления открываемости Al, As и тяжелых металлов с помощью данной методики были использованы сертифицированные растительные материалы: листья чая TEA LEAVES INST-TL-1 (INST, Польша) и лишайник Lichen Certified reference material BCR 482 (Institute for reference materials and measurements, Бельгия).

Образцы, предварительно высушенные до постоянной массы, подвергали разложению в концентрированной азотной кислоте при температуре 165 °С в системе микроволновой пробоподготовки Milestone EthosUp (Milestone). Элементный анализ природных объектов проводили с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7900 (Agilent Technologies, США). Количественное определение содержания элементов осуществляли, фиксируя интенсивности сигналов по следующим атомным единицам массы (а.е.м.): Al – 27, V – 51, Cr – 52, Mn – 55, Fe – 56, Co – 59, Ni – 60, Cu – 63, Zn – 66, As – 75, Sr – 88, Mo – 95, Cd – 111, Ba – 137, Hg – 202, Pb – 208.

Для отслеживания дрейфа приборных параметров использовали внутренние стандарты (висмут (Lot BCBZ3947, Sigma-Aldrich), родий, германий (Lot PGE2C7, Reagecon)). Для расчета концентраций применяли метод калибровочной кривой. Использовали следующие стандартные растворы для ИСП-анализа: мультиэлементный № IV (Lot HC90682355, Merck), моноэлементные висмута (Lot BCBZ3947), ртути (Lot BCBV3560), молибдена (Lot BCBT9509), олова (Lot BCBT9505), родия (Lot BCBW5968) – все Sigma-Aldrich, палладия (Lot PPD2819L1, Reagecon), сурьмы (Lot N9304293, Perkin Elmer). Для каждого из образцов за результат измерения брали усредненное значение, полученное от трех параллельных проб, в пяти повторностях каждая (15 измерений).

Результаты и обсуждение

Собственные экспериментальные и литературные данные о содержании нормируемых ЭТ в семенах тыквы различного происхождения представлены в таблице 1.

Согласно собственным результатам исследования As и Hg практически не содержатся в изученных образцах семян тыквы, что хорошо согласуется с литературными данными об особенностях накопления этих элементов наземными растениями [22]. Содержание Cd значительно ниже ПДК (1 мг/кг)¹², его средняя концентрация в изучаемых объектах составляет 0,03 мг/кг при максимальном значении 0,1 мг/кг, что хорошо согласуется с литературными данными об уровне содержания этого токсиканта в масличных культурах

¹² ОФС.1.5.3.0009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

Таблица 1. Содержание нормируемых элементных токсикантов в семенах тыквы различного происхождения

Table 1. Content of the specified elemental toxicants in pumpkin seeds of different origin

Место сбора / время сбора <i>Harvesting area / time</i>	Элементный токсикант, концентрация, мг/кг <i>Element, concentration, mg/kg</i>			
	As	Cd	Hg	Pb
г. Кубинка, МО / 2021* <i>Kubinka, Moscow Region / 2021*</i>	ND	0,010 ± 0,001	ND	ND
с. Кемля, Респ. Мордовия / 2021* <i>Kemlya, Rep. Mordovia / 2021*</i>	ND	0,009 ± 0,001	ND	ND
с. Ичалки, Респ. Мордовия / 2021 <i>Ichalki, Rep. Mordovia / 2021</i>	ND	0,045 ± 0,003	ND	ND
с. Первомайск, Респ. Мордовия / 2021* <i>Pervomaysk, Rep. Mordovia / 2021*</i>	ND	0,044 ± 0,002	ND	ND
с. Инелей, Респ. Мордовия / 2021* <i>Ineley, Rep. Mordovia / 2021*</i>	0,009 ± 0,001	0,021 ± 0,001	ND	0,121 ± 0,09
	0,013 ± 0,001	0,017 ± 0,001	ND	0,179 ± 0,05
г. Красногорск, МО / 2021* <i>Krasnogorsk, Moscow Region / 2021*</i>	ND	0,042 ± 0,002	ND	0,227 ± 0,02
г. Жуковский, МО / 2021* <i>Zhukovsky, Moscow Region / 2021*</i>	ND	0,007 ± 0,001	ND	ND
ООО «Здоровье» / 2019* <i>Zdorovye OOO / 2019*</i>	ND	0,048 ± 0,004	ND	ND
ООО «Здоровье» / 2019* <i>Zdorovye OOO / 2019*</i>	ND	0,007 ± 0,001	ND	ND
ООО «Здоровье» / 2019* <i>Zdorovye OOO / 2019*</i>	ND	0,088 ± 0,003	ND	ND
с. Абрамцево, МО / 2021* <i>Abramtsevo, Moscow Region / 2021*</i>	0,006 ± 0,001	0,056 ± 0,005	ND	0,226 ± 0,02
дер. Холдеево, МО / 2021* <i>Kholdeyev, Moscow Region / 2021*</i>	ND	ND	ND	0,013 ± 0,001
с. Конобеево, МО / 2021* <i>Konobeevo, Moscow Region / 2021*</i>	0,007 ± 0,001	0,108 ± 0,004	ND	ND
г. Звенигород, МО / 2021* <i>Zvenigorod, Moscow Region / 2021*</i>	ND	0,039 ± 0,001	ND	ND
с. Староюрьево, Тамбовская обл. / 2021* <i>Staroyurievo, Tambov Region / 2021*</i>	ND	0,006 ± 0,001	ND	ND
ООО «Беловодье» 2021* <i>Belovodye, OOO 2021*</i>	ND	0,007 ± 0,001	ND	ND
р-н Сергиево-Посадский, МО / 2021* <i>Sergiev Posad, Moscow Region / 2021*</i>	ND	0,009 ± 0,001	ND	0,237 ± 0,01
	ND	0,012 ± 0,001	ND	0,399 ± 0,02
	ND	0,013 ± 0,001	ND	0,023 ± 0,001
д. Липово, Чувашская Респ. / 2021* <i>Lipovo, Chuvash Rep. / 2021*</i>	ND	0,009 ± 0,001	ND	0,311 ± 0,02
Бенгази, Ливия / 2021 [14] <i>Benghazi, Libya / 2021 [14]</i>	ND	ND	ND	0,006
Швейцария / 2002–2007 [15] <i>Switzerland / 2002–2007 [15]</i>	–	0,1	<0,02	0,560
Зенджан, Иран / 2014 [16] <i>Zanjan, Iran / 2014 [16]</i>	–	0,073	–	0,121 ± 0,106
Эсфахан, Иран / 2014 [16] <i>Isfahan, Iran / 2014 [16]</i>	–	ND	–	0,235
Шираз, Иран / 2014 [16] <i>Shiraz, Iran / 2014 [16]</i>	–	ND	–	ND

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Место сбора / время сбора <i>Harvesting area / time</i>	Элементный токсикант, концентрация, мг/кг <i>Element, concentration, mg/kg</i>			
	As	Cd	Hg	Pb
Мешхед, Иран / 2014 [16] <i>Mashhad, Iran / 2014 [16]</i>	–	ND	–	0,58 ± 0,35
Хамадан, Иран / 2014 [16] <i>Hamadan, Iran / 2014 [16]</i>	–	ND	–	ND
Хой, Иран / 2014 [16] <i>Khoy, Iran / 2014 [16]</i>	–	ND	–	0,132 ± 0, 48
Литва / 2012–2013 [17] <i>Lithuania / 2012–2013 [17]</i>	–	0,002	–	0,090
Сеул, Республика Корея / 2008–2010 [18] <i>Seoul, Korea / 2008–2010 [18]</i>	–	0,55 ± 0,28	–	ND
Бербис, Гайана [19] <i>Berbice, Guyana [19]</i>	–	17	–	ND
Эссекибо, Гайана [19] <i>Essequibo, Guyana [19]</i>	–	12	–	ND
Демерара, Гайана [19] <i>Demerara, Guyana [19]</i>	–	22	–	ND
Бурса, Турция [20] <i>Bursa, Turkey [20]</i>	0,049 ± 0,004	0,028 ± 0,004	–	0,027 ± 0,002
Зиндер, Нигер / 2004 [21] <i>Zinder, Niger / 2004 [21]</i>	0,45	ND	–	ND

Примечание. «–» – данные по элементу отсутствуют; «ND» – содержание элемента ниже предела обнаружения, МО – Московская область.

* – собственные экспериментальные данные.

Note. – no data available for the element; ND—the element content is below the detection limit.

* experimental data obtained by the authors.

(0,04–0,1 мг/кг [23]). В то же время по литературным данным семена тыквы способны накапливать Cd в больших количествах. Так, аномально высокое содержание Cd (12–22 мг/кг) обнаружено в образцах *Cucurbita maxima* из различных районов Гайаны [19]. Следует отметить, что в данной стране произошла крупнейшая в Латинской Америке техногенная катастрофа, повлекшая за собой попадание большого количества токсичных отходов золотодобывающих шахт в окружающую среду [24]. Как следствие, в сельскохозяйственных растениях данного региона наблюдается повышенное содержание Cd [25].

Среднее содержание Pb в исследованных образцах семян тыквы составляет 0,08 мг/кг при максимальном значении 0,4 мг/кг, что значительно ниже ПДК (6 мг/кг)¹³. По литературным данным содержание этого элемента в семенах тыквы не превышает 0,6 мг/кг [16]. В целом

уровень содержания Pb в семенах тыквы сопоставим с его содержанием в масличных культурах (0,13–0,35 мг/кг) [23].

Экспериментальные и литературные данные о содержании ненормируемых тяжелых металлов и Al в семенах тыквы различного происхождения представлены в таблице 2. В нее не включена информация о Tl, так как он не обнаружен ни в одном из испытуемых образцов, литературные данные о содержании этого элемента в семенах тыквы также отсутствуют. При этом средний уровень содержания Tl в наземных высших растениях составляет 0,1–1,5 мг/кг [26]. Следует отметить, что в литературе практически не представлена информация о содержании в семенах тыквы Al, V, Cr, Sr, Mo и Se. Относительно больше литературных данных приводится для эссенциальных и условно эссенциальных элементов, таких как Co, Fe, Zn, Cu, Mn и Ni.

¹³ Там же.

Среднее содержание элементов в семенах тыквы убывает в следующем порядке: Fe>Zn>Mn>Cu>Al>Mo>Ni>Sr>Cr>Se>Pb>Co>Cd>As>V>Tl (табл. 2). Максимальные концентрации составляют (мг/кг): Al – 9,37 (9,21), Mn – 73,1 (1,54), Fe – 213 (200), Zn – 184 (190), Se – 1,79 (1,29), Pb – 0,40 (0,58). Для сравнения в скобках приведены максимальные концентрации соответствующих элементов, взятые из литературных источников [14, 17, 19–21, 27–36]. Расхождение между установленными нами и представленными в литературе максимальными уровнями накопления Al, Mn, Fe, Zn, Se, Pb семенами тыквы не превышает 30%. Можно предположить, что элементный состав сопряженных почв различных географических районов не оказывает существенного влияния на способность семян тыквы аккумулировать эти элементы. Уровень аккумуляции V, Cr, Co, Ni, Cu, As, Sr, Mo, Cd, напротив, зависит от географического места произрастания тыквы. Необходимо проведение дополнительных исследований, связанных с изучением перехода данных элементов из сопряженных почв в морфологические части тыквы. Большой интерес представляют данные об аккумулятивной способности семян тыквы из различных районов Гайаны, где произошла техногенная катастрофа [19]. В этих образцах обнаружены Co (17 мг/кг) и Ni (66 мг/кг) в аномально высоких концентрациях. Можно предположить, что при сильном воздействии антропогенного фактора защитные барьеры растения оказываются неэффективны, в семенах тыквы накапливаются ЭТ в аномально высоких концентрациях.

Для выявления индивидуальных особенностей накопления элементов семенами тыквы целесообразно сравнить их элементный состав с элементным составом генеративных органов других растений. Генеративные органы растения характеризуются хорошей механической защитой, исключающей поверхностное загрязнение, и являются морфологической частью растения, максимально удаленной от сопряженной почвы. В таблице 3 приведены сравнительные данные по содержанию ненормируемых элементов в семенах тыквы и в семенах, зернах и бобах масличных (арахис, соя, рис, пшеница, кориандр, рапс, горчица, рыжик, сурепица, лен, кукуруза, миндаль, кунжут¹⁴), зерновых (овес, ячмень, гречиха, рожь) и зернобобовых (фасоль, горох) культур.

Сравнительный анализ накопления ТМ и АТ различными семенами, зернами и бобами сельскохозяйственных культур позволяет выявить ряд особенностей, характерных для семян тыквы. Например, семена тыквы характеризуются высоким содержанием Zn, Mo и Sr: их средние концентрации в данном нативном продукте существенно превышают содержание этих элементов в других рассмотренных сельскохозяйственных культурах. Присутствие в семенах тыквы значительного количества Zn отмечено во многих работах [21, 32, 34, 43, 44]. Этот элемент необходим для нормального развития и полового созревания человека, адекватного функционирования его иммунной системы, обеспечения нормального кроветворения, стимулирования процессов регенерации ран¹⁵. Характерно, что соединения Zn, содержащиеся в семенах тыквы, отличаются высокой биодоступностью, поэтому Всемирная организация здравоохранения рекомендует использовать семена тыквы как источник Zn для человека [43]. Литературных данных о способности семян тыквы накапливать Mo и Sr нами не обнаружено.

Уровень содержания Fe в семенах тыквы уступает только его содержанию в семенах кунжута [38, 39, 41], которые традиционно добавляют в пищевые продукты для повышения содержания в них данного эссенциального элемента [44]. При этом концентрация Fe в семенах хлопка, льна, арахиса, сафлора, подсолнечника, сурепицы, горчицы, рапса, рыжика [23, 41], а также в зерновых культурах [42] существенно ниже, чем в семенах тыквы. Аналогичная картина наблюдается для Cu, Cr и Ni.

Среднее содержание Mn в семенах тыквы выше, чем в семенах кунжута и других масличных культур [23, 38, 39], однако уступает его содержанию в зерне, где этот эссенциальный элемент может накапливаться в больших количествах [22, 37]. Уровень содержания Co, Se, Cr, Ni в семенах тыквы сопоставим с его концентрацией в семенах масличных и зерновых культур. Установленный нами уровень содержания Al и V в семенах тыквы существенно ниже, чем представленный в литературе для зернового сырья [22, 37] и кунжута [38].

Для объяснения выявленных особенностей накопления семенами тыквы тяжелых

¹⁴ ТР ТС 024/2011 Технический регламент Таможенного союза. Технический регламент на масложировую продукцию.

¹⁵ Trace elements in human nutrition and health. Geneva: WHO; 1996.

Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok: WHO; 2002.

Таблица 2. Содержание ненормируемых элементных токсикантов в семенах тыквы различного происхождения
Table 2. Content of the unspecified elemental toxicants in pumpkin seeds of different origins

Место сбора / время сбора Harvesting area / time	Элементный токсикант, концентрация, мг/кг Element, concentration, mg/kg												
	Al	V	Cr	Co	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni	Sr	Mo	Se	
г. Кубинка, МО / 2021* Kubinka, Moscow Region / 2021*	9,37 ± 0,09	ND	0,21 ± 0,01	0,11 ± 0,01	107 ± 3	115 ± 10	11,6 ± 0,6	40,8 ± 3,0	1,64 ± 0,11	0,31 ± 0,02	1,88 ± 0,08	ND	
с. Кемля, Респ. Мордовия / 2021* Kemlya, Rep. Mordovia / 2021*	1,44 ± 0,05	ND	0,16 ± 0,001	0,02 ± 0,001	52,4 ± 1,1	76,6 ± 3,9	6,17 ± 0,49	30,1 ± 2,0	2,35 ± 0,15	0,46 ± 0,02	1,82 ± 0,07	0,21 ± 0,01	
с. Ичалки, Респ. Мордовия / 2021* Ichalki, Rep. Mordovia / 2021*	2,90 ± 0,19	ND	0,18 ± 0,01	0,02 ± 0,001	93,4 ± 1,4	76,0 ± 1,5	10,23 ± 0,57	42,4 ± 3,4	2,54 ± 0,23	0,46 ± 0,01	2,15 ± 0,13	ND	
с. Первомайск, Респ. Мордовия / 2021* Pervomaysk, Rep. Mordovia / 2021*	0,31 ± 0,02	ND	0,18 ± 0,01	0,07 ± 0,005	74,1 ± 4,9	68,2 ± 2,7	7,69 ± 0,75	34,0 ± 2,2	2,32 ± 0,20	0,98 ± 0,05	2,20 ± 0,17	0,59 ± 0,02	
с. Инелей, Респ. Мордовия / 2021* Ineley, Rep. Mordovia / 2021*	1,51 ± 0,12	0,004 ± 0,001	0,44 ± 0,04	0,11 ± 0,002	79,9 ± 5,2	73,3 ± 5,0	9,10 ± 0,21	41,3 ± 0,4	2,62 ± 0,13	0,91 ± 0,05	2,21 ± 0,20	0,84 ± 0,01	
г. Красногорск, МО / 2021* Krasnogorsk, Moscow Region / 2021*	1,33 ± 0,12	0,009 ± 0,001	0,37 ± 0,03	0,06 ± 0,003	113 ± 7,3	90,0 ± 6,1	9,08 ± 0,18	45,3 ± 1,9	2,80 ± 0,25	1,06 ± 0,1	1,94 ± 0,05	1,79 ± 0,05	
г. Жуковский, МО / 2021* Zhukovskiy, Moscow Region / 2021*	ND	0,001 ± 0,001	0,340,02	0,007 ± 0,002	81,3 ± 5,32	119 ± 6,6	18,8 ± 1,50	29,6 ± 1,4	ND	1,39 ± 0,13	0,41 ± 0,01	ND	
г. Жуковский, МО / 2021* Zhukovskiy, Moscow Region / 2021*	3,29 ± 0,25	ND	0,18 ± 0,01	0,04 ± 0,002	87,1 ± 8,0	45,7 ± 2,4	12,1 ± 1,0	34,2 ± 2,9	0,98 ± 0,005	2,47 ± 0,03	2,31 ± 0,20	ND	
ООО «Здоровье» / 2019* Zdorovye OOO / 2019*	3,17 ± 0,23	ND	0,16 ± 0,01	0,04 ± 0,002	74,5 ± 5	107 ± 10,1	35,2 ± 1,5	37,9 ± 2,0	1,96 ± 0,02	2,11 ± 0,20	1,50 ± 0,12	ND	
ООО «Здоровье» / 2019* Zdorovye OOO / 2019*	3,82 ± 0,15	ND	0,17 ± 0,01	0,03 ± 0,001	69,1 ± 5,1	64,4 ± 3,5	10,4 ± 0,9	42,6 ± 1,5	1,64 ± 0,05	0,72 ± 0,02	1,97 ± 0,02	0,46 ± 0,02	
ООО «Здоровье» / 2019* Zdorovye OOO / 2019*	2,98 ± 0,15	0,002 ± 0,001	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,01	105 ± 9	97,1 ± 3,7	13,7 ± 2,2	51,4 ± 5,0	2,93 ± 0,09	2,97 ± 0,15	0,78 ± 0,03	0,58 ± 0,01	
с. Абрамцево, МО / 2021* Abramtsevo, Moscow Region / 2021*	1,60 ± 0,05	0,003 ± 0,001	0,33 ± 0,01	0,02 ± 0,001	90,3 ± 7,5	75,2 ± 4,9	17,5 ± 1,6	40,1 ± 2,1	0,92 ± 0,02	0,94 ± 0,05	1,10 ± 0,01	ND	
дер. Холдево, МО / 2021* Kholdevo, Moscow Region / 2021*	1,37 ± 0,08	0,002 ± 0,001	0,29 ± 0,02	ND	68,1 ± 2,1	84,1 ± 2,2	16,1 ± 0,4	46,0 ± 1,4	0,91 ± 0,01	0,77 ± 0,04	ND	ND	
с. Конобеево, МО / 2021* Konobeevo, Moscow Region / 2021*	1,53 ± 0,04	0,001 ± 0,001	0,45 ± 0,03	0,10 ± 0,01	121 ± 9,2	101 ± 6,5	13,5 ± 1,0	50,0 ± 3,5	2,97 ± 0,18	0,85 ± 0,05	1,49 ± 0,10	ND	

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Место сбора / время сбора <i>Harvesting area / time</i>	Элементный токсикант, концентрация, мг/кг <i>Element, concentration, mg/kg</i>											
	Al	V	Cr	Co	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni	Sr	Mo	Se
г. Звенигород, МО / 2021* <i>Zvenigorod, Moscow Region / 2021*</i>	ND	0,002 ± 0,001	0,41 ± 0,03	0,06 ± 0,003	68,2 ± 2,7	110 ± 3	12,2 ± 0,8	55,6 ± 1,7	0,008 ± 0,001	0,17 ± 0,01	1,93 ± 0,06	ND
с. Староурьево, Тамбовская обл. / 2021* <i>Starouryevo, Tambov region / 2021*</i>	5,43 ± 0,44	0,01 ± 0,001	0,21 ± 0,02	0,05 ± 0,001	125 ± 5,0	49,3 ± 1,6	14,5 ± 1,2	48,5 ± 2,9	1,17 ± 0,05	5,61 ± 0,25	2,12 ± 0,09	0,21 ± 0,02
ООО «Беловодье» / 2021* <i>Belovodye, OOO / 2021*</i>	5,46 ± 0,29	0,01 ± 0,001	0,19 ± 0,01	0,06 ± 0,004	112 ± 1,0	59,7 ± 1,5	15,3 ± 0,9	48,9 ± 4,5	0,85 ± 0,03	2,78 ± 0,25	1,99 ± 0,06	0,07 ± 0,001
0,23 ± 0,01	ND	0,31 ± 0,03	0,002 ± 0,001	53,4 ± 5,2	82,2 ± 2,8	29,6 ± 0,8	35,5 ± 2,9	ND	0,58 ± 0,09	1,84 ± 0,11	ND	ND
р-н Сергиево-Посадский, МО / 2021* <i>Sergiev Posad, Moscow Region / 2021*</i>	0,45 ± 0,01	0,001 ± 0,001	0,34 ± 0,02	ND	53,9 ± 2,5	83,4 ± 4,5	53,9 ± 4,0	33,5 ± 1,5	ND	0,46 ± 0,03	1,91 ± 0,08	ND
3,02 ± 0,02	0,002 ± 0,001	0,22 ± 0,01	0,008 ± 0,001	68,1 ± 3,3	90,0 ± 5,0	29,6 ± 2,8	34,1 ± 2,5	ND	0,32 ± 0,02	0,25 ± 0,01	ND	ND
д. Липово, Чувашская Респ. / 2021* <i>Lipovo, Resp. Chuvashia / 2021*</i>	1,33 ± 0,03	0,003 ± 0,001	0,16 ± 0,01	0,023 ± 0,001	212 ± 10	183 ± 9	23,7 ± 0,5	73,1 ± 1,1	4,69 ± 0,21	2,31 ± 0,09	3,59 ± 0,06	ND
Бенгази, Ливия / 2021 [14] <i>Benghazi, Libya / 2021 [14]</i>	-	-	-	-	31 ± 1,1	-	8,8 ± 0,1	-	-	-	-	ND
Бурса, Турция [20] <i>Bursa, Turkey [20]</i>	2,55 ± 1,03	-	0,087 ± 0,007	0,116 ± 0,01	61,30 ± 2,34	59,16 ± 2,31	10,65 ± 0,31	42,66 ± 1,03	1,93 ± 0,12	-	-	0,041 ± 0,008
Бербис, Гайана [19] <i>Berbice, Guyana [19]</i>	-	-	-	4,19	36,21	31,88	4,28	-	66,76	-	-	-
Эссекибо, Гайана [19] <i>Essequibo, Guyana [19]</i>	-	-	-	6,34	36,52	18,22	2,00	-	51,68	-	-	-
Демерара, Гайана [19] <i>Demerara, Guyana [19]</i>	-	-	-	17,44	56,39	27,78	2,97	-	50,62	-	-	-
Чебика, Тунис [27] <i>Chebika, Tunisia [27]</i>	-	-	-	-	70,7 ± 6,6	84,2 ± 8,4	-	39,3 ± 2,5	-	-	-	-
Конья, Турция / 2010–2013 [28]. <i>Konya, Turkey / 2010–2013 [28]</i>	-	-	-	-	71,50 ± 1,87	83,04 ± 1,09	23,49 ± 1,28	42,04 ± 1,78	2,49 ± 0,78	-	-	-
Литва / 2012–2013 [17] <i>Lithuania / 2012–2013 [17]</i>	-	-	0,82	-	-	93,43	11,65	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Место сбора / время сбора <i>Harvesting area / time</i>	Элементный токсикант, концентрация, мг/кг <i>Element, concentration, mg/kg</i>											
	Al	V	Cr	Co	Fe	Zn	Cu	Mn	Ni	Sr	Mo	Se
Акуре, Нигерия [29] <i>Akure, Nigeria [29]</i>	-	-	-	ND	42,70	39,85	ND	17,93	-	-	-	-
Эр-Рмяд, Саудовская Аравия / 1999–2000 [30] <i>Riyadh, Saudi Arabia / 1999–2000 [30]</i>	-	-	-	-	136,6	10,9	3,0	-	-	-	-	-
Зиндер, Нигер / 2004 [21] <i>Zinder, Niger / 2004 [21]</i>	9,21	ND	2,84	0,29	106,0	113,0	15,4	49,3	0,53	1,83	0,805	1,29
Венгрия / 1993 [31] <i>Hungary / 1993 [31]</i>	-	-	-	-	200,0	190,0	20,0	80,0	-	-	-	-
Краснодарский край / 2007 [32] <i>Krasnodar region / 2007 [32]</i>	-	-	-	-	62,1	65,4	9,6	27,3	-	-	-	-
Краснодарский край / 2007 [32] <i>Krasnodar region / 2007 [32]</i>	-	-	-	-	65,4	69,8	9,8	31,2	-	-	-	-
Краснодарский край / 2007 [32] <i>Krasnodar region / 2007 [32]</i>	-	-	-	-	82,2	83,3	14,6	37,4	-	-	-	-
Россия / 2018 [33] <i>Russia / 2018 [33]</i>	-	-	0,05 ± 0,012	0,07 ± 0,015	95,0 ± 16	73,0 ± 0,9	11,0 ± 0,2	65,0 ± 1,2	2,0 ± 0,08	-	-	-
Кадуна, Нигерия / 2012 [34] <i>Kaduna, Nigeria / 2012 [34]</i>	-	-	-	0,6 ± 0,01	37,5 ± 0,02	141,4 ± 2,0	-	21,7 ± 0,02	-	-	-	-
Найроби, Кения / 2015 [35] <i>Nairobi, Kenya / 2015 [35]</i>	-	1,54 ± 0,17	5,26 ± 0,37	-	-	53,54 ± 1,44	-	-	-	-	-	0,016 ± 0,001
Джессор, Бангладеш / 2019 [36] <i>Jessore, Bangladesh / 2019 [36]</i>	-	-	-	-	60,17 ± 5,8	187,77 ± 5,00	3,10 ± 0,10	13,50 ± 0,10	-	-	-	-

Примечание. «-» — данные по элементу отсутствуют; «ND» — содержание элемента ниже предела обнаружения, MO — Московская область. Жирным шрифтом выделены аномально высокие концентрации элемента.

* — собственные экспериментальные данные.

Note. — no data available for the element; ND—the element content is below the detection limit; MO—Moscow region. Bold font indicates abnormal concentration of elements.
* experimental data obtained by the authors.

Таблица 3. Содержание тяжелых металлов и алюминия в семенах, зернах и бобах различных сельскохозяйственных культур

Table 3. Content of heavy metals and aluminum in seeds, grains, and beans of various agricultural crops

Элемент <i>Element</i>	Диапазон концентраций металлов, мг/кг (среднее значение, мг/кг) <i>Metal concentration range, mg/kg (mean value, mg/kg)</i>				
	Семена тыквы* <i>Pumpkin seeds*</i>	Масличные культуры <i>Oil-bearing crops</i>	Источник <i>Reference</i>	Зерновые и зернобобовые культуры <i>Grain and leguminous crops</i>	Источник <i>Reference</i>
Al	0,23–9,37 (2,71)	(31,00) (4,40–14,45)	[22] [37]	(38–70) (5,20–19,70)	[22] [37]
V	0,001–1,540 (0,070)	0,0006–0,0100 0,04–0,14 (0,06) (0,93–1,72)	[22] [38] [37]	0,0009–0,0076 (1,21–2,00)	[22] [37]
Cr	0,050–5,26 (0,56)	0,0002–0,2900 0,10–2,10 (0,63) 0,07–0,14 (0,10) (0,028–0,08)	[22] [39] [38] [37]	0,01–0,60 (0,060–0,128)	[22] [37]
Co	0,002–0,600 (0,080)	0,001–0,380 9,30–53,30 (35,92) 0,09–0,31 (0,14) 0,11–0,15 (0,13) (0,01–0,03) (0,053–0,069)	[22] [39] [38] [40] [23] [37]	0,004–0,300 0,069–0,118 (0,097) (0,036–0,080)	[22] [40] [37]
Fe	31,0–212,0 (86,6)	(10–104) 9–81 32–56 (32) 35,2–231,5 (105,7) 53,2–97,9 (71,8) (7,91–32,47)	[41] [22] [42] [39] [38] [23]	33–218 13–43 (28)	[22] [42]
Zn	10,9–190,0 (88,8)	(9–60) 1–41 12,5–42,5 (27,5) 43,09–80,09 (61,79) 44,50–70,80 (52,25) 26,2–31,4 (28,8) (39,8–48,0)	[41] [22] [42] [39] [38] [40] [23]	20–37 11,5–38,5 (25,0) 17,74–29,90 (22,40)	[22] [42] [40]
Cu	3,0–43,9 (14,7)	1,3–10,0 1,9–4,3 (3,1) 12,20–25,20 (19,46) 19,0–27,0 (22,6) 3,16–3,66 (3,41) (0,45–0,99)	[22] [42] [39] [38] [40] [23]	2–15 2,0–5,0 (3,5) 2,38–3,32 (2,78)	[22] [42] [40]
Mn	13,5–80,0 (41,26)	16–103 12–40 (26) 14,60–35,90 (22,98) 14,4–34,7 (19,4) 20,09–23,29 (1,60) (12,8–29,0) (10,9–37,4)	[22] [42] [39] [38] [40] [23] [37]	10–121 13–29 (21) 16,86–22,94 (19,55) (14,8–52,5)	[22] [42] [40] [37]
Ni	0,008–4,69 (1,61)	0,17–1,70 1,00–2,84 (1,61) (0,428–0,838)	[22] [38] [37]	0,1–8,0 (0,260–0,803)	[22] [37]
Sr	0,17–5,61 (1,36)	0,06–2,30 (0,245)	[22] [37]	1,8–3,2 (0,262–0,614)	[22] [37]
Mo	0,2–3,59 (1,65)	0,18 0,71–1,47 (1,18) (0,236–0,267)	[22] [38] [37]	0,9–1,75 (0,138–0,39)	[22] [37]
Se	0,016–1,79 (0,24)	0,0002–253 0,11–0,24 (0,17) (0,2–0,3)	[22] [38] [37]	(0,187–0,258)	[37]

Примечание. *Данные из Гайаны не учитывались.

Note. * Data from Guyana were not taken into account.

металлов и Al необходимо проведение дополнительных исследований их трансредовых переходов из сопряженных почв в морфологические части тыквы (корни, стебель, листья, кожура, мякоть).

Выводы

В ходе проведенных исследований изучен широкий спектр элементных токсикантов, а также эссенциальных и условно-эссенциальных элементов в ЛРС и нативных продуктах «Тыквы семена» с использованием методов ИСП-МС и микроволнового разложения в закрытых сосудах. На основе оценки собственных экспериментальных и литературных данных об элементном составе семян тыквы можно сделать следующие выводы:

- 1) содержание нормируемых элементных токсикантов (As, Cd, Hg, Pb) в исследованных образцах ЛРС и ЛРП «Тыквы семена» не превышает ПДК, установленных ГФ РФ XIV;
- 2) ненормируемые токсичные элементы либо не присутствуют в семенах тыквы (Tl), либо присутствуют в незначительных количествах (Al);
- 3) содержание ряда эссенциальных элементов (Zn, Fe, Mn, Cu, Mo, Cr) в семенах тыквы выше, чем в семенах многих масличных культур;
- 4) место произрастания тыквы не оказывает существенного влияния на содержание исследованных элементов в семенах тыквы, так как их концентрации варьируют в узком диапазоне;
- 5) в условиях сильного загрязнения окружающей среды семена тыквы способны накапливать аномально высокие количества Cd, Co, Ni.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кузьмина НЕ, Шукин ВМ, Северинова ЕЮ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Изменение подходов к нормированию содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(7):52–6. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2015-49-7-52-56> [Kuz'mina NE, Shchukin VM, Severinova EYu, Yashkir VA, Merkulov VA. Changes in the approaches to the normalization of heavy metal contents in medicinal herbs and herbal medicines (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(7):490–4] <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1312-y>
2. Шукин ВМ, Ерина АА, Лисман ЕС, Ваганова ОА. Проблемы нормирования мышьяка в бурых водорослях и лекарственных препаратах на их основе. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(3):167–72. [Shchukin VM, Erina AA, Lisman ES, Vaganova OA. Problems of establishing limits for arsenic content in brown algae and brown algae-containing medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ehkspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):167–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-167-172>
3. Dorić M, Vidaković S, Kraljić K, Škevin D, Drakula S, Ćurić D. Application of cryogenic grinding pretreatment to enhance extractability of bioactive molecules from pumpkin seed cake. *J Food Process Eng*. 2019;42(8):e13300. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13300>
4. Salehi B, Capanoglu E, Adrar N, Catalkaya G, Shaheen S, Jaffer M, et al. Cucurbits plants: a key emphasis to its pharmacological potential. *Molecules*. 2019;24(10):1854. <https://doi.org/10.3390/molecules24101854>
5. Lim TK. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Netherlands: Springer Science+Business Media; 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0_40
6. Спасов АА, Иежица ИН, Гурова НА, Ивахненко ИВ. Биологически активные пищевые добавки в гастроэнтерологии: современное состояние проблемы. *Новые лекарства и новости фармакотерапии*. 2002;13(1):27–40. [Spasov AA, Iezhitsa IN, Gurova NA, Ivakhnenko IV. Dietary supplement in gastroenterology: current state of the problem. *Novye lekarstva i novosti farmakoterapii = New Drugs and Pharmacotherapy News*. 2002;13(1):27–40 (In Russ.)]
7. Vahlensieck W, Theurer C, Pfitzer E, Patz B, Banik N, Engelmann U. Effects of pumpkin seed in men with lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia in the one-year, randomized, placebo-controlled GRANU study. *Urol Int*. 2015;94(3):286–95. <https://doi.org/10.1159/000362903>
8. Schulz V, Hänsel R, Blumenthal M, Tyler VE. *Rational phytotherapy: a reference guide for physicians and pharmacists*. Springer Science & Business Media; 2004.
9. Пегова РА, Воробьева ОА, Кольчик ОВ, Большакова АЕ, Жильцова ОЕ, Мельникова НБ. Растительные масла. Состав и перспективы использования масла семян тыквы Cucurbita pepo в терапии (обзор). *Медицинский альманах*. 2014;(2):127–34. [Pegova RA, Vorobieva OA, Kol'chik OV, Bol'shakova AE, Zhil'tsova OE, Mel'nikova NB. Vegetable oils. Composition and prospects for the use of cucurbita pepo pumpkin seed oil in therapy (review). *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*. 2014;(2):127–34 (In Russ.)]
10. Wahid S, Alqahtani A, Khan RA. Analgesic and anti-inflammatory effects and safety profile of Cucurbita maxima and Cucumis sativus seeds. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(8):4334–41. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.020>
11. Dotto JM, Chacha JS. The potential of pumpkin seeds as a functional food ingredient: a review. *Sci Afr*. 2020;10:e00575. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00575>

12. Минтель МВ, Землянова МА, Жданова-Заплевичко ИГ. Некоторые аспекты совместного действия алюминия и фтора на организм человека (обзор литературы). *Экология человека*. 2018;(9):12–7. [Intel MV, Zemlyanova MA, Zhdanova-Zaplevichko IG. Some aspects of synergistic action of aluminum and fluorine on the human body (literature review). *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*. 2018;(9):12–7 (In Russ.)]
13. Шукин ВМ, Жигилей ЕС, Ерина АА, Швецова ЮН, Кузьмина НЕ, Лутцева АИ. Валидация методики определения ртути, свинца, кадмия и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах на его основе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(9):57–64. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-9-57-64> [Shchukin VM, Zhigilei ES, Erina AA, Shvetsova YuN, Kuz'mina NE, Luttseva AI. Validation of an ICP-MS method for the determination of mercury, lead, cadmium and arsenic in medicinal plants and related drug preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(9):968–76] <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02306-8>
14. Saad SS, Elmabsout AA, Alshukri A, El-Mani S, Al Mesmary E, Alkuwafi I, et al. Approximate composition analysis and nutritive values of different varieties of edible seeds. *Asian J Med Sci*. 2021;12(6):101–8. <https://doi.org/10.3126/ajms.v12i6.33792>
15. Gasser U, Klier B, Kühn AV, Steinhoff B. Current findings on the heavy metal content in herbal drugs. *Pharmeur Sci Notes*. 2009;(1):37–50. PMID: 19275871
16. Torki Z, Mehrasebi MR, Nazari F, Kamali K, Hosseini MJ. Concentration and exposure assessments of cadmium and lead in pumpkin, sunflower, watermelon, and jabooni seeds collected in Iran. *Fruits*. 2018;73(4):236–42. <https://doi.org/10.17660/th2018/73.4.5>
17. Danilcenko H, Gajewski M, Jariene E, Paulauskas V, Mažeika R. Effect of compost on the accumulation of heavy metals in fruit of oilseed pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca*). *J Elem*. 2016;21(1):21–31. <https://doi.org/10.5601/jelem.2015.20.2.905>
18. Chung KH, Shin KO, Hwang HJ, Choi KS. Chemical composition of nuts and seeds sold in Korea. *Nutr Res Pract*. 2013;7(2):82–8. <https://doi.org/10.4162/nrp.2013.7.2.82>
19. Mahabir V, Verma V. Application of atomic absorption spectroscopy in food sciences (A study on *Cucurbita maxima*). *APCBEE Procedia*. 2012;2:135–40. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.025>
20. Kafaoğlu B, Fisher A, Hill S, Kara D. Chemometric evaluation of trace metal concentrations in some nuts and seeds. *Food Addit Contam Part A*. 2014;31(9):1529–38. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.947331>
21. Glew RH, Glew RS, Chuang LT, Huang YS, Millson M, Constans D, Vanderjagt DJ. Amino acid, mineral and fatty acid content of pumpkin seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* nuts in the Republic of Niger. *Plant Foods Hum Nutr*. 2006;61(2):49–54. <https://doi.org/10.1007/s11130-006-0010-z>
22. Kabata-Pendias A. *Trace elements in soils and plants*. 4th ed. Boca Raton: CRC press; 2011.
23. Серов СН, Асхадуллин ДФ. Содержание микроэлементов и тяжелых металлов в семенах масличных культур. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. 2010;204:251–4. [Serov SN, Askhadullin DF. Microelements and heavy metals content in oil-yielding crops. *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Baumana = Scientific Notes of the Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2010;204:251–4 (In Russ.)]
24. Gedicks A. *Resource rebels: native challenges to mining and oil corporations*. Cambridge MA: South End Press; 2001.
25. Nankishore A. Heavy metal levels in leafy vegetables from selected markets in Guyana. *Int J Agric Technol*. 2014;10(3):651–63.
26. Furini A, ed. *Plants and heavy metals*. Dordrecht: Springer Science & Business Media; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4441-7>
27. Rezig L, Chouaibi M, Meddeb W, Msaada K, Hamdi S. Chemical composition and bioactive compounds of Cucurbitaceae seeds: potential sources for new trends of plant oils. *Process Saf Environ*. 2019;127:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.05.005>
28. Seymen M, Uslu N, Türkmen Ö, Al Juhaimi F, Özcan MM. Chemical compositions and mineral contents of some hull-less pumpkin seed and oils. *J Am Oil Chem Soc*. 2016;93(8):1095–9. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2850-5>
29. Amoo IA, Eleyinmi AF, Illelaboye NO, Akoja SS. Characterisation of oil extracted from gourd (*Cucurbita maxima*) seed. *J Food Agric Environ*. 2004;2(2):38–9.
30. Alfawaz MA. Chemical composition and oil characteristics of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed kernels. *Food Sci Agric Res*. 2004;(129):5–18.
31. Mansour EH, Dworschák E, Lugasi A, Barna É, Gergely A. Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita Pepo* Kakai 35) seed products. *J Sci Food Agric*. 1993;61(1):73–8. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740610112>
32. Васильева АГ, Круглова ИА. Химический состав и потенциальная биологическая ценность семян тыквы различных сортов. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2007;(5–6):30–3. [Vasilieva AG, Kruglova IA. Chemical composition and potential biological value of pumpkin seeds of various varieties. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Pishchevaya tekhnologiya = Proceedings of Higher Educational Institutions. Food Technology*. 2007;(5–6):30–3 (In Russ.)]
33. Шевякова ЛВ, Бессонов ВВ. Микроэлементный состав семян тыквы. *Вопросы питания*. 2018;87(5):126–7. [Shevyakova LV, Bessonov VV. Trace element composition of pumpkin seeds. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2018;87(5):126–7 (In Russ.)]
34. Elinge CM, Muhammad A, Atiku FA, Itodo AU, Peni JJ, Sanni OM, et al. Proximate, mineral and anti-nutrient composition of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds extract. *Int J Plant Res*. 2012;2(5):146–50. <https://doi.org/10.5923/j.plant.20120205.02>

35. Muchemi GN, Wanjau RN, Murungi IJ, Njue WM. Assessment of essential trace elements in selected food grains, herbal spices and seeds commonly used in Kenya. *Afr J Food Sci.* 2015;9(8):441–7. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1333>
36. Amin MZ, Islam T, Uddin MR, Uddin MJ, Rahman MM, Satter MA. Comparative study on nutrient contents in the different parts of indigenous and hybrid varieties of pumpkin (*Cucurbita maxima* Linn.). *Heliyon.* 2019;5(9):e02462. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02462>
37. Урубков СА, Хованская СС, Дремина НВ, Смирнов СО. Анализ химического состава и пищевой ценности зернового сырья для производства продуктов детского питания. *Пищевая промышленность.* 2018;(8):16–21. [Urubkov SA, Khovanskaya SS, Dremina NV, Smirnov SO. Analysis of the chemical composition and nutritional value of grain raw materials for the production of baby foods. *Pishcheyaya promyshlennost' = Food Industry.* 2018;(8):16–21 (In Russ.)]
38. Hu J, Zhou L. Assessment of microelements in six varieties of sesame seeds using ICP-MS. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2019;330(4):042063.
39. Pandey S, Majumder E, Dasgupta T. Genotypic variation of microelements concentration in sesame (*Sesamum indicum* L.) mini core collection. *Agricultural Research.* 2017;6(2):114–21. <https://doi.org/10.1007/s40003-017-0252-z>
40. Василовский АМ, Волошин ЕИ, Скударнов СЕ. Миграция и транслокация микроэлементов в системе «Почва – подземные воды – зерновые и овощи» в сельскохозяйственных районах Красноярского края. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета.* 2010;(8):64–7. [Vasilovsky AM, Voloshin EI, Skudarnov SE. Migration and translocation of microelements in the system «soil – underground waters – grain and vegetables» in the agricultural areas of Krasnoyarsk region. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Vestnik of the Krasnoyarsk State Agrarian University.* 2010;(8):64–7 (In Russ.)]
41. McKeivith B. Nutritional aspects of oilseeds. *Nutr Bull.* 2005;30(1):13–26. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2005.00472.x>
42. Кондратенко ЕП, Константинова ОБ, Соболева ОМ, Ижмулкина ЕА, Вербицкая НВ. Оценка уровня накопления макро- и микроэлементов зерном озимых культур, выращенных на юго-востоке Западной Сибири. *Достижения науки и техники АПК.* 2015;29(6):18–20. [Kondratenko EP, Konstantinova OB, Soboleva OM, Izhmulkina EA, Verbitskaya NV. Level evaluation of macro- and micronutrients accumulation by grane of winter crops grown in the southeast of Western Siberia. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2015;29(6):18–20 (In Russ.)]
43. Ovca A, van Elteren JT, Falnoga I, Šelih VS. Speciation of zinc in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*) and degradation of its species in the human digestive tract. *Food Chem.* 2011;128(4):839–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.102>
44. Захарова АС, Кузьмина СС, Егорова ЕЮ, Козубаева ЛА. Формирование пищевой ценности булочных изделий с мукой из семян масличных культур. *Ползуновский вестник.* 2020;(4):3–9. [Zakharova AS, Kuz'mina SS, Egorova EYu, Kozubaeva LA. Formation of the nutritional value of bakery products with flour from oilseeds. *Polzunovskiy vestnik = Polzunovsky Bulletin.* 2020;(4):3–9 (In Russ.)] <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2020.04.001>

Вклад авторов. С.В. Овсиенко – идея, планирование исследования, разработка дизайна исследования, интерпретация результатов исследования; В.М. Шукин – сбор образцов, поиск литературы и систематизация литературных данных, написание текста; Е.А. Блинкова – пробоподготовка, проведение эксперимента; Н.Е. Кузьмина – сбор образцов, редактирование текста.

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).

Authors' contributions. Sergey V. Ovsienko—elaboration of the idea and design of the study, planning of the study, interpretation of the obtained results; Viktor M. Shchukin—collection of samples, literature review and systematisation, writing of the text; Elena A. Blinkova—sample preparation, conducting of experiments; Natalia E. Kuz'mina—collection of samples, editing of the text.

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).

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.

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

Овсиенко Сергей Васильевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9649-716X>
ovsienko@expmed.ru

Шукин Виктор Михайлович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9440-0950>
Schukin@expmed.ru

Блинкова Елена Александровна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-4740>
blinkovaea@expmed.ru

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук.

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

Sergey V. Ovsienko.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9649-716X>
ovsienko@expmed.ru

Victor M. Shchukin.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9440-0950>
Schukin@expmed.ru

Elena A. Blinkova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4813-4740>
blinkovaea@expmed.ru

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

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

Статья поступила 09.12.2021

После доработки 19.01.2022

Принята к печати 04.03.2022

Article was received 9 December 2021

Revised 19 January 2022

Accepted for publication 4 March 2022



В.И. Топоркова¹ 
А.О. Понкратова¹ 
А.К. Уэйли¹ 
В.Г. Лужанин² 
М.Ю. Гончаров¹ 

Применение спектральных методов анализа для установления структуры индивидуальных вторичных метаболитов, выделенных из надземной части хохлатки крупноприцветниковой

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Проф. Попова, д. 14а, Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Екатерининская, д. 110, Пермь, 614990, Российская Федерация

✉ Понкратова Анастасия Олеговна; anastasiya.ponkratova@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Растения рода *Corydalis* (*Papaveraceae*) широко используются в восточной медицине и отличаются богатым содержанием биологически активных веществ. Один из представителей рода во флоре России – хохлатка крупноприцветниковая (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) распространена на территории Западной и Восточной Сибири, однако ее химический состав недостаточно изучен. **Цель работы:** проведение фитохимического анализа травы хохлатки крупноприцветниковой (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) путем выделения в индивидуальном виде и определения структуры основных вторичных метаболитов современными хроматографическими методами анализа и ЯМР-спектроскопией. **Материалы и методы:** высушенная надземная часть культивируемого растения *C. bracteata*. Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности – Dianion® HP-20 (Supelco) и Sephadex® LH-20 (GE Healthcare), а также методом препаративной ВЭЖХ на колонке Kromasil® C18 с детектированием при 235 нм. В качестве элюента использовали смеси вода–ацетонитрил в соотношениях от 5:95 до 50:50 по объему с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты. Анализ фракций перед объединением проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Анализ растворов полученных индивидуальных соединений проводили методом ВЭЖХ на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu) с колонкой SUPELCOSIL™ LC-18 и детектированием при 235 и 280 нм. Структуры выделенных индивидуальных соединений устанавливали методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии на приборе Bruker Avance III 400 МГц. **Результаты:** из надземной части *C. bracteata* выделены и охарактеризованы четыре индивидуальных соединения: алкалоид изохинолинового ряда – коптизин, флавоноиды – рутин, кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозид и кемпферол-3-О-β-D-глюкопиранозид. **Выводы:** при проведении фитохимического анализа надземной части хохлатки крупноприцветниковой впервые были выделены соединения как алкалоидной, так и флавоноидной природы, структура которых была доказана с помощью ЯМР-спектроскопии. *C. bracteata* следует рассматривать в качестве перспективного потенциального источника биологически активных веществ.

Ключевые слова: хохлатка крупноприцветниковая; *Corydalis bracteata*; флавоноиды; алкалоиды; вторичные метаболиты; селективное выделение; ЯМР-спектроскопия

Для цитирования: Топоркова В.И., Понкратова А.О., Уэйли А.К., Лужанин В.Г., Гончаров М.Ю. Применение спектральных методов анализа для установления структуры индивидуальных вторичных метаболитов, выделенных из наземной части хохлатки крупноприцветниковой. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(1):56–64. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-56-64>

V.I. Toporkova¹ 
 A.O. Ponkratova¹ 
 A.K. Whaley¹ 
 V.G. Luzhanin² 
 M.Yu. Goncharov¹ 

The Use of Spectroscopic Methods for Structural Elucidation of Individual Secondary Metabolites Isolated from the Aerial Parts of *Corydalis bracteata*

¹ St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

² Perm State Pharmaceutical Academy, 101, Ekaterininskaya St., Perm 614990, Russian Federation

✉ Anastasiia O. Ponkratova; anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ABSTRACT

Plants of the *Corydalis* (*Papaveraceae*) genus are widely used in oriental medicine and are known for their particularly rich content of biologically active substances. One of the species encountered in Russia, the large-flowered corydalis (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.), is widespread in Western and Eastern Siberia, but none the less its chemical composition has not been properly studied yet. **The aim of the study** was to perform phytochemical analysis of *Corydalis bracteata* herb through isolation of the main secondary metabolites and elucidation of their structure, using modern chromatographic methods of analysis and NMR spectroscopy. **Materials and methods:** the analysis was performed for dried aerial parts of *C. bracteata*. The isolation of individual compounds was performed using open-column chromatography and glass columns packed with sorbents with different selectivity characteristics—Dianion[®] HP-20 (Supelco) and Sephadex[®] LH-20 (GE Healthcare)—as well as preparative-scale chromatography with a Kromasil[®] C18 column and detection at 235 nm. Water and acetonitrile mixed in the ratios 5:95–50:50 v/v with the addition of 0.1% trifluoroacetic acid were used as the eluents. The analysis of fractions before pooling was performed by high-performance thin-layer chromatography with Silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck). The analysis of the individual compound solutions was performed by HPLC using a Prominence LC-20 (Shimadzu) instrument, a SUPELCOSIL[™] LC-18 column, and detection at 235 nm. The structures of the isolated individual compounds were elucidated by one- and two-dimensional NMR spectroscopy using a Bruker Avance III 400 MHz NMR spectrometer. **Results:** four individual compounds from the *C. bracteata* aerial parts were isolated and analysed: an isoquinoline alkaloid—coptisine (1) and three flavonoids—rutin (2), quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (3), and kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (4). **Conclusions:** as a result of the phytochemical analysis of the *C. bracteata* aerial parts, compounds of both alkaloid and flavonoid nature were isolated for the first time, and their structures were elucidated using NMR spectroscopy. *C. bracteata* should be considered as a promising potential source of biologically active substances.

Key words: large-flowered corydalis; *Corydalis bracteata*; flavonoids; alkaloids; secondary metabolites; selective isolation; NMR spectroscopy

For citation: Toporkova V.I., Ponkratova A.O., Whaley A.K., Luzhanin V.G., Goncharov M.Yu. The use of spectroscopic methods for structural elucidation of individual secondary metabolites isolated from the aerial parts of *Corydalis bracteata*. *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):56–64. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-56-64>

Введение

Растения рода *Corydalis* (*Papaveraceae*) широко используются в восточной медицине благодаря содержанию большого количества биологически активных веществ [1, 2]. В результате ранее проведенных исследований химического состава [2–8] из различных видов *Corydalis* были выделены изохинолиновые алкалоиды следующих классов: протоберберинового, бензофенантрдинового, апорфинового, протопинового, бензилохинолинового, морфинанов и спиробензилохинолинового. Наиболее изученные виды хохлатки, такие как *Corydalis yanhusuo*, описанная в Европейской и Китайской фармакопеях, и *Corydalis decumbens*, описанная в Китайской фармакопее [9], наряду с другими видами *Corydalis* применяются как болеутоляющие средства в виде таблеток, гранул, порошков и экстрактов для облегчения боли при гастралгии, мигрени и дисменорее, как противовоспалительные средства для лечения ревматизма и заболеваний печени, а также для лечения сердечной аритмии [2, 10–13]. В то же время информация по применению вида *Corydalis bracteata* в народной и традиционной медицине отсутствует.

Хохлатка крупноприцветниковая (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) представляет собой многолетнее травянистое растение с длинными черешковыми тройчато рассеченными листьями и дуговидно изогнутыми крупными цветками желтого цвета с восходящим шпорцем, собранными в соцветие кисть. *C. bracteata* произрастает в Азии и широко распространена в Западной и Восточной Сибири и Монголии. Ранее в *C. bracteata* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) были идентифицированы 12 алкалоидов, однако выделение их в индивидуальном виде из *C. bracteata*, наряду с изучением химического состава соединений, относящихся к другим классам, в данном растении ранее не проводилось [1].

Актуальность данного исследования обусловлена широким спектром биологической активности изохинолиновых алкалоидов, а также отсутствием

данных о вторичных метаболитах растения, относящихся к другим классам [2, 10, 11, 14–19].

Цель работы – проведение фитохимического анализа травы хохлатки крупноприцветниковой (*Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers.) путем выделения в индивидуальном виде и определения структуры основных вторичных метаболитов современными хроматографическими методами анализа и ЯМР-спектроскопией.

Материалы и методы

Надземная часть *C. bracteata* собрана в фазу цветения на территории Ботанического института им. В. Л. Комарова Российской академии наук (Санкт-Петербург). Поскольку хохлатка крупноприцветниковая занесена в Красные книги Бурятской АССР и Иркутской области, а также включена в списки редких и исчезающих растений Сибири, для дальнейших исследований следует использовать культивируемое растение.

Сырье перед экстракцией подвергали воздушно-теневого сушке, измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Предварительно осуществляли выбор оптимального экстрагента. В пять колб вместимостью 200 мл помещали по 10 г сырья *C. bracteata* и добавляли 100 мл соответствующего экстрагента: гексана, дихлорметана, бутанола, 70 или 96% этилового спирта. Экстракцию проводили в плотно закрытых колбах при комнатной температуре в течение 48 ч. Полученные экстракты анализировали методом ВЭЖХ на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu) с диодно-матричным детектором при длинах волн 235 и 280 нм. Использовали колонку SUPELCOSIL™ LC-18 (250×4,6 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки – 40 °С. Объем вводимой пробы – 10 мкл. В качестве элюента использовали смеси вода–ацетонитрил в соотношениях от 5:95 до 0:100 по объему с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты. Время анализа – 50 мин. Было установлено, что использование 96% этилового спирта позволяет получить экстракт из *C. bracteata*

с наибольшим качественным и количественным содержанием производных флавоноидов и алкалоидов, поэтому данный экстрагент был выбран для дальнейшей работы.

800 г измельченного сырья подвергали многократной экстракции 96% этиловым спиртом (7500 мл) при комнатной температуре с использованием механической мешалки (Heidolph). Экстракция проводилась до того момента, пока полученный экстракт не становился бледным по сравнению с первоначальным. Все полученные спиртовые экстракты объединяли и выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph) при 60 °С до объема 350 мл. К 350 мл экстракта добавляли 100 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую жидкостно-жидкостную (ЖЖ) экстракцию с равными объемом *n*-гексана. После чего к водно-спиртовому остатку добавляли 200 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую ЖЖ экстракцию с равным объемом дихлорметана. В заключение проводили ЖЖ экстракцию водно-спиртового остатка с равным объемом бутанола.

Дихлорметановую фракцию выпаривали досуха на вакуумно-ротационном испарителе, после чего сухой остаток растворяли в 96% этиловом спирте. Образовавшийся нерастворимый в 96% этаноле осадок отфильтровывали, промывали 96% этанолом и затем растворяли в 10 мл воды очищенной. Таким образом было получено соединение **1** массой (m_1) = 24,15, (время удерживания на колонке SUPELCOSIL™ LC-18 в описанных выше условиях анализа (t_{R1}) = 27,445).

Бутанольную фракцию выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 50% этаноле и загружали на колонку, заполненную сорбентом Dianion® HP20 (Supelco, CAS 9052-95-3). Проводили градиентное элюирование с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10% (соотношение вода – 96% этанол от 100:0 до 0:100 по объему). Собранные фракции анализировали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с целью выявления фракций со схожими компонентами. ВЭТСХ выполняли на приборе CAMAG® (аппликатор для полуавтоматического нанесения образцов Linomat 5, автоматическая камера для хроматографирования пластин Automatic Developing Chamber 2, изображения получали при помощи TLC Visualizer 2), с использованием пластин для ВЭТСХ Silica gel 60 F₂₅₄ с размером частиц сорбента 4–8 мкм (Merck, кат. № 105642)

в системе растворителей *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:2).

Фракции, которым на хроматограмме соответствовали пятна с одинаковыми факторами удерживания (R_f) и окраской, – объединяли. Объединенные фракции выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 20 мл и анализировали методом ВЭЖХ на колонке SUPELCOSIL™ LC-18 в описанных выше условиях для выбора фракций с наибольшим содержанием определяемых веществ.

Фракцию, полученную при элюировании колонки 40% этанолом, загружали на открытую колонку, заполненную сорбентом Sephadex® LH-20 (GE Healthcare), и подвергали изократическому элюированию 50% этанолом. Полученные фракции анализировали методом ВЭТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которым на хроматограмме соответствовали пятна с одинаковыми факторами удерживания (R_f) и окраской, – объединяли. Объединенные фракции выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 20 мл. Таким образом было получено 12 фракций. Полученные фракции анализировали методом ВЭЖХ для выбора фракций с наибольшим содержанием определяемых веществ. Выбранные фракции 8 и 10 подвергали хроматографическому разделению на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе Smartline (Knauer) со спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Применяли препаративную хроматографическую колонку Kromasil® C18 (250×30 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм. Скорость потока подвижной фазы составляла 40 мл/мин. В качестве элюента использовали смеси вода–ацетонитрил в соотношениях от 5:95 до 50:50 по объему с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты.

Из фракции 8 было выделено соединение **2** (m_2 = 45,15 мг, t_{R2} = 19,347 мин), а из фракции 10 соединения **3** (m_3 = 16,15 мг, t_{R3} = 19,819 мин) и **4** (m_4 = 12,65 мг, t_{R4} = 20,965 мин).

Структуры выделенных индивидуальных соединений устанавливали методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии на приборе Bruker Avance III 400 МГц (Bruker NMR Technology). Растворитель – ДМСО-*d*₆. Параметры ¹H-ЯМР анализа: ширина спектра – 24,9917 ppm (10 000 Гц), угол поворота намагниченности – 30°, задержка на релаксацию – 1 с, количество накоплений сигнала свободной индукции – 16,

число точек аналого-цифрового преобразования – 64к, способ калибровки шкалы химических сдвигов – относительно остаточных сигналов дейтерорастворителя. Параметры NOESY анализа: задержка на релаксацию – 1,93 с, количество накоплений сигнала свободной индукции на 1 инкремент – 8, число точек аналого-цифрового преобразования 2к на 128, время смешивания 0,7 с.

Результаты и обсуждение

Соединение **1** представляет собой оранжевое кристаллическое вещество, УФ-спектр которого имеет максимумы поглощения при 265, 358 и 484 нм. ¹H-ЯМР спектр соединения содержал сигналы 14 протонов, среди которых присутствовали две спиновые системы. Первая спиновая система состояла из двух дублет-дублетов в алифатической области спектра, каждый из которых интегрировался на два протона и соответствовал двум соседним CH₂ группам при δН 4,88 (2Н, дд, J = 7,2; 6,0 Гц) и 3,20 (2Н, дд, J = 7,2; 6,0 Гц) м.д. Сильный химический сдвиг метиленовой группы при 4,88 м.д. может быть обусловлен только наличием в соседнем положении от него положительно заряженного атома азота дегидроизохинолиновой системы. Вторая спиновая система состояла из двух дублетов

Таблица 1. ¹H-ЯМР данные соединения **1** – коптисин

Table 1. ¹H NMR data of compound **1** – coptisine

Положение <i>Position</i>	δН (J, Гц/Hz)
1	7,80 (1H, c) 7.80 (1H, s)
4	7,09 (1H, c) 7.09 (1H, s)
5	3,20 (2H, т, J = 7,2; 6,0) 3.20 (2H, t, J = 7.2, 6.0)
6	4,88 (2H, т, J = 7,2; 6,0) 4.88 (2H, t, J = 7.2, 6.0)
8	9,95 (1H, c) 9.95 (1H, s)
11	7,83 (1H, д, J = 8,7) 7.83 (1H, d, J = 8.7)
12	8,05 (1H, д, J = 8,7) 8.05 (1H, d, J = 8.7)
13	8,96 (1H, c) 8.96 (1H, s)
2,3-OCH ₂ O	6,18 (2H, c) 6.18 (2H, s)
9,10-OCH ₂ O	6,54 (2H, c) 6.54 (2H, s)

в ароматической области спектра при δН 8,05 (1Н, д, J = 8,7 Гц) и 7,83 (1Н, д, J = 8,7 Гц) м.д. Исходя из константы спин-спиновой взаимодействия в 8,7 Гц очевидно, что данные ароматические протоны расположены в ортоположении относительно друг друга. Все остальные 8 протонов, представленные в ¹H-ЯМР спектре, являются синглетами, интегрирующимися на 1 или 2 протона при δН 6,18 (2Н, с), 6,54 (2Н, с), 7,09 (1Н, с), 7,80 (1Н, с), 8,96 (1Н, с) и 9,95 (1Н, с) м.д. Наличие ароматических синглетов, сдвинутых в область более слабого поля при 8,96 (1Н, с) и 9,95 (1Н, с) м.д., и положительно заряженного атома азота указывает на то, что данные протоны находятся в электронодефицитной N-замещенной пиридиновой системе. Синглеты при δН 6,18 (2Н, с) и 6,54 (2Н, с) м.д. указывают на наличие двух метилendioкси-групп в молекуле. Исходя из вышеперечисленных спектральных данных было установлено, что соединение **1** является представителем протоберберинового алкалоидов, но в зависимости от расположения двух метилendioкси-групп в протоберберинового системе наблюдаемые спектральные характеристики могут потенциально соответствовать, по крайней мере, четырем возможным изомерам. В результате структура соединения **1** была установлена как коптисин на основе анализа ¹H-ЯМР данных (табл. 1) и анализа соответствующих NOESY корреляций.

Доказательством структуры коптисина являются NOESY корреляции от 4-Н (δН 7,09 м.д.) к протонам 5-CH₂ группы (δН 3,20 м.д.), от протонов 6-CH₂ группы (δН 4,88 м.д.) к 8-Н (δН 9,95 м.д.) и от 13-Н (δН 8,96 м.д.) к 12-Н (δН 8,05 м.д.) и 1-Н (δН 7,80 м.д.) (рис. 1).

Соединение **2** – желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы УФ-поглощения

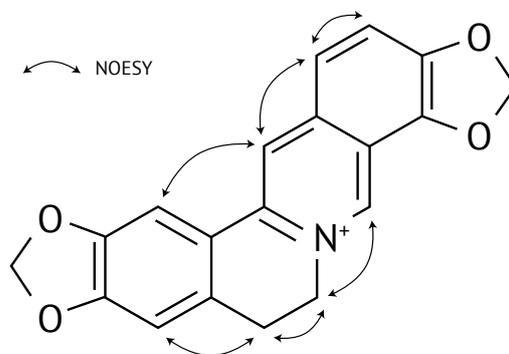


Рис. 1. Ключевые NOESY корреляции коптисина

Fig. 1. Key NOESY correlations of coptisine

при 255 и 351 нм. В ^1H -ЯМР спектре (табл. 2) присутствовали сигналы, характерные для рутина – наличие спиновой системы кольца А, состоящей из протонов 6-Н при δH 6,20 (1H, д, $J = 2,0$ Гц), и 8-Н 6,40 (1H, д, $J = 2,0$ Гц) м.д., и спиновой системы кольца В, состоящей из протонов 2'-Н при δH 7,54 (1H, уш. с), 5'-Н 6,85 (1H, д, $J = 8,6$ Гц) и 6'-Н 7,55 (1H, дд, $J = 8,6; 2,0$ Гц) м.д. Сигналы аномерных протонов остатков глюкозы 1''-Н и рамнозы 1'''-Н находились при δH 5,35 (1H, д, $J = 7,3$ Гц) и 4,39 (1H, д, $J = 1,2$ Гц) м.д. соответственно. Таким образом, на основании анализа спектральных данных и сравнения их с литературными данными, предполагается, что соединение **2** является рутином [20].

Соединение **3** представляет собой желтое кристаллическое вещество с максимумами УФ-поглощения при 254 и 351 нм. В ^1H -ЯМР

спектре присутствовали сигналы, характерные для остатков кверцетина и глюкозы (табл. 2). В ароматической области спектра наблюдались сигналы спиновой системы кольца А, состоящей из протонов 6-Н при δH 6,21 (1H, д, $J = 1,9$ Гц) и 8-Н 6,41 (1H, д, $J = 1,9$ Гц) м.д., и спиновой системы кольца В, состоящей из протонов 2'-Н при δH 7,58 (1H, д, $J = 2,1$ Гц), 5'-Н 6,85 (1H, д, $J = 9,0$ Гц) и 6'-Н 7,55 (1H, дд, $J = 9,0; 2,1$ Гц) м.д. Сигнал аномерного протона остатка глюкозы 1''-Н наблюдался при δH 5,47 (1H, д, $J = 7,3$ Гц) м.д. В результате анализа полученных спектральных данных и сравнения их с литературными данными предполагается, что соединение **3** представляет собой кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид [21].

Соединение **4** представляет собой желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы

Таблица 2. ^1H -ЯМР данные соединений **2–4** – рутин, кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид, кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид

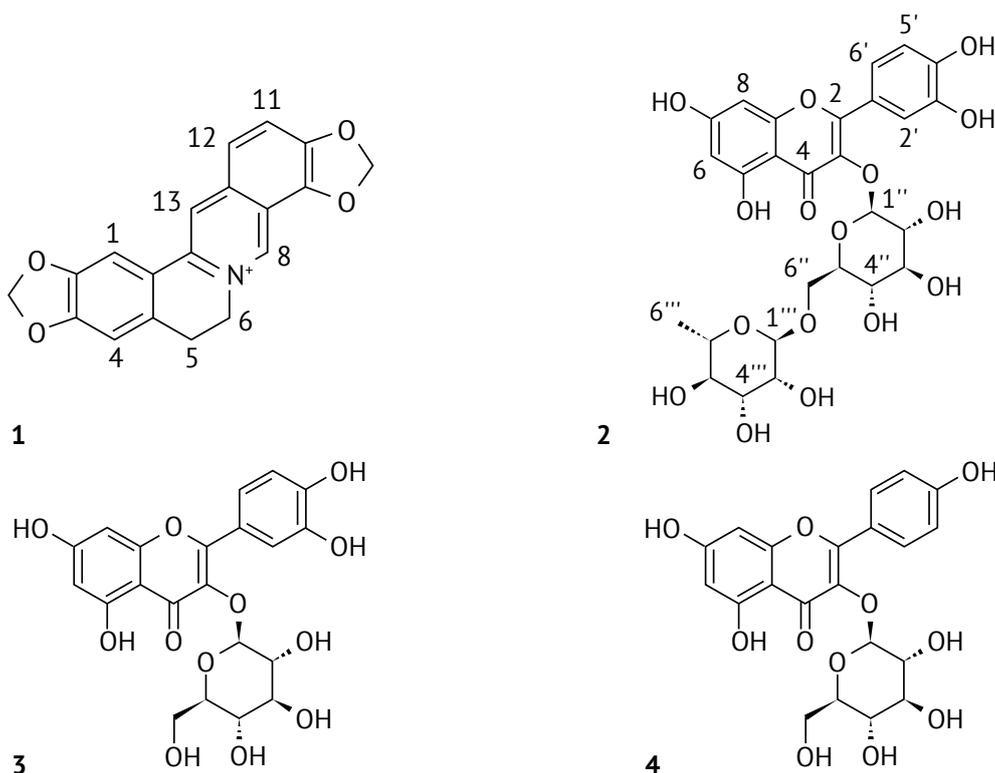
Table 2. ^1H NMR data of compounds **2–4**: rutine, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, and kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside

Положение <i>Position</i>	Соединение 2 <i>Compound 2</i> δH (J, Гц/Hz)	Положение <i>Position</i>	Соединение 3 <i>Compound 3</i> δH (J, Гц/Hz)	Положение <i>Position</i>	Соединение 4 <i>Compound 4</i> δH (J, Гц/Hz)
6	6,20 (1H, д, $J = 2,0$) 6.20 (1H, d, $J = 2.0$)	6	6,21 (1H, д, $J = 1,9$) 6.21 (1H, d, $J = 1.9$)	6	6,22 (1H, д, $J = 2,0$) 6.22 (1H, d, $J = 2.0$)
8	6,40 (1H, д, $J = 2,0$) 6.40 (1H, d, $J = 2.0$)	8	6,41 (1H, д, $J = 1,9$) 6.41 (1H, d, $J = 1.9$)	8	6,45 (1H, д, $J = 2,0$) 6.45 (1H, d, $J = 2.0$)
2'	7,54 (1H, уш. с) 7.54 (1H, brs)	2'	7,58 (1H, д, $J = 2,1$) 7.58 (1H, d, $J = 2.1$)	2', 6'	8,04 (2H, д, $J = 8,9$) 8.04 (2H, d, $J = 8.9$)
5'	6,85 (1H, д, $J = 8,6$) 6.85 (1H, d, $J = 8.6$)	5'	6,85 (1H, д, $J = 9,0$) 6.85 (1H, d, $J = 9.0$)	3', 5'	6,89 (2H, д, $J = 8,9$) 6.89 (2H, d, $J = 8.9$)
6'	7,55 (1H, дд, $J = 8,6; 2,0$) 7.55 (1H, dd, $J = 8.6, 2.0$)	6'	7,58 (1H, дд, $J = 9,0; 2,1$) 7.58 (1H, dd, $J = 9.0, 2.1$)	1''	5,46 (1H, д, $J = 7,3$) 5.46 (1H, d, $J = 7.3$)
1''	5,35 (1H, д, $J = 7,3$) 5.35 (1H, d, $J = 7.3$)	1''	5,47 (1H, д, $J = 7,3$) 5.47 (1H, d, $J = 7.3$)	2''– 6''	3,09–3,57 (6H, м) 3.09–3.57 (6H, m)
2''– 6''	3,08–3,73 (6H, м) 3.08–3.73 (6H, m)	2''– 6''	3,09–3,59 (6H, м) 3.09–3.59 (6H, m)	5-OH	12,62 (1H, с) 12.62 (1H, s)
1'''	4,39 (1H, д, $J = 1,2$) 4.39 (1H, d, $J = 1.2$)	5-OH	12,65 (1H, с) 12.65 (1H, s)	7-OH	10,89 (1H, с) 10.89 (1H, s)
2'''– 5'''	3,08–3,72 (5H, м) 3.08–3.72 (5H, m)	7-OH	10,86 (1H, с) 10.86 (1H, s)		
6'''	1,0 (3H, д, $J = 6,2$) 1.0 (3H, d, $J = 6.2$)	3''-OH	9,21 (1H, с) 9.21 (1H, s)		
5-OH	12,60 (1H, с) 12.60 (1H, s)			4''-OH	10,20 (1H, с) 10.20 (1H, s)
7-OH	10,84 (1H, с) 10.84 (1H, s)				
3''-OH	9,17 (1H, с) 9.17 (1H, s)	4''-OH	9,81 (1H, с) 9.81 (1H, s)		
4''-OH	9,67 (1H, с) 9.67 (1H, s)				

поглощения в УФ-спектре при 265 и 347 нм. В ^1H -ЯМР спектре соединения **4** присутствовали сигналы, характерные для остатков кемпферола и глюкозы (табл. 2). В ароматической области спектра наблюдались сигналы спиновой системы кольца А, состоящей из протонов 6-Н при δH 6,22 (1H, д, $J = 2,0$ Гц) и 8-Н 6,45 (1H, д, $J = 2,0$ Гц) м.д., и спиновой системы кольца В, состоящей из протонов 2',6' при δH 8,04 (2H, д, $J = 8,9$ Гц) и 3',5'-Н при δH 6,89 (2H, д, $J = 8,9$ Гц) м.д. Сигнал аномерного протона остатка глюкозы 1''-Н наблюдался при δH 5,46 (1H, д, $J = 7,3$ Гц)

м.д. В результате анализа спектральных данных и сравнения их с литературными данными предполагается, что соединение **4** представляет собой кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид [22].

В результате исследования из надземной части *C. bracteata* были выделены и охарактеризованы четыре индивидуальных соединения: коптизин (**1**) [23], рутин (**2**) [20], кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид (**3**) [21] и кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид (**4**) [22], структуры которых представлены ниже:



Заключение

В результате фитохимического изучения надземной части *Corydalis bracteata* (Steph. ex Willd.) Pers. методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности, а также методом препаративной ВЭЖХ было выделено одно соединение, относящееся к классу алкалоидов, и три соединения, относящихся к классу флавоноидов. Структура выделенных соединений была охарактеризована с помощью ЯМР-спектроскопии. Соединение **1** представ-

ляет собой алкалоид изохинолинового ряда – коптизин, соединение **2** – рутин, соединение **3** – кверцетин-3-О- β -D-глюкопиранозид, соединение **4** – кемпферол-3-О- β -D-глюкопиранозид. Соединения **2–4** обнаружены в растениях рода *Corydalis* впервые, а также все соединения выделены впервые из вида *C. bracteata*. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что надземная часть *C. bracteata* является перспективным источником биологически активных веществ как алкалоидной, так и флавоноидной природы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Khodorova NV, Shavarda AL, Lequart-Pillon M, Laberche JC, Voitsekhovskaja OV, Boitel-Conti M. Biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloids in *Corydalis bracteata*: compartmentation and seasonal dynamics. *Phytochemistry*. 2013;92:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.008>
2. Iranshahi M, Quinn RJ, Iranshahi M. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. *RSC Adv*. 2014;4(31):15900–13. <https://doi.org/10.1039/C3RA47944G>
3. Jha RN, Pandey MB, Singh AK, Singh S, Singh VP. New alkaloids from *Corydalis* species. *Nat Prod Res*. 2009;23(3):250–5. <https://doi.org/10.1080/14786410801996390>
4. Xiao HT, Peng J, Liang Y, Yang J, Bai X, Hao XY, et al. Acetylcholinesterase inhibitors from *Corydalis yanhusuo*. *Nat Prod Res*. 2011;25(15):1418–22. <https://doi.org/10.1080/14786410802496911>
5. Liu Z, Mi Z, Wang P, Chang S, Han N, Yin J. Two new alkaloids from the tubers of *Corydalis ambigua* subsp. *amurensis* and their anti-proliferative activity. *Nat Prod Res*. 2020;34(23):3305–12. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1566821>
6. Yao HN, Peng ZT, Zhang YF, Liu DF, Huang BF, Tu PF, et al. Alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Corydalis racemosa* (Thunb.) Pers. *Nat Prod Res*. 2021;35(22):4272–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1696796>
7. Muhammad N, Lal Shrestha R, Adhikari A, Wadood A, Khan H, Khan AZ, et al. First evidence of the analgesic activity of govaniadine, an alkaloid isolated from *Corydalis gowaniana* Wall. *Nat Prod Res*. 2015;29(5):430–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.951933>
8. Tong S, Yan J, Lou J. Preparative isolation and purification of alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by high-speed counter-current chromatography. *J Liq Chrom Relat Technol*. 2005;28(18):2979–89. <https://doi.org/10.1080/10826070500274638>
9. Jiang L, Li M, Zhao F, Chu S, Zha L, Xu T, et al. Molecular identification and taxonomic implication of herbal species in genus *Corydalis* (Papaveraceae). *Molecules*. 2018;23(6):1393. <https://doi.org/10.3390/molecules23061393>
10. Khodorova NV, Miroslavov EA, Shavarda AL, Laberche J, Boitel-Conti M. Bud development in *Corydalis* (*Corydalis bracteata*) requires low temperature: a study of developmental and carbohydrate changes. *Ann Bot*. 2010;105(6):891–903. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq076>
11. Wang L, Zhang Y, Wang Z, Gong N, Kweon TD, Vo B, et al. The antinociceptive properties of the *Corydalis yanhusuo* extract. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162875>
12. Zhang J, He S, Wang J, Wang C, Wu J, Wang W, et al. A review of the traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology of *Corydalis yanhusuo*. *Nat Prod Commun*. 2020;15(9):1934578X2095775. <https://doi.org/10.1177/1934578X20957752>
13. Zhang S, Ouyang F, Wang C, Gu M. Fingerprint of tablet of *Corydalis tuber* for alleviating pain by HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2007;31(3):452–64. <https://doi.org/10.1080/10826070701780870>
14. Chlebek J, Korabecny J, Dolezal R, Stepankova S, Perez DI, Hostalkova A, et al. In vitro and in silico acetylcholinesterase inhibitory activity of thalicttricavine and canadine and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Molecules*. 2019;24(7):1340. <https://doi.org/10.3390/molecules24071340>
15. Kim YJ, Lim HS, Kim Y, Lee J, Kim BY, Jeong S-J. Neuroprotective effect of *Corydalis ternata* extract and its phytochemical quantitative analysis. *Chem Pharm Bull*. 2017;65(9):826–32. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00300>
16. Kim KH, Lee IK, Choi SU, Lee JH, Moon E, Kim SY, et al. New triterpenoids from the tubers of *Corydalis ternata*: structural elucidation and bioactivity evaluation. *Planta Med*. 2011;77(13):1555–8. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270781>
17. Guo J, Wang SB, Yuan TY, Wu YJ, Yan Y, Li L, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation. *Atherosclerosis*. 2013;231(2):384–91. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.003>
18. Chen H, Luo C, Liang J, Zhang Z, Lin G, Wu J, et al. Anti-inflammatory activity of coptisine free base in mice through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2017;811:222–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.027>
19. Friedemann T, Schumacher U, Tao Y, Leung AKM, Schröder S. Neuroprotective activity of coptisine from *Coptis chinensis* (Franch). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:827308. <https://doi.org/10.1155/2015/827308>
20. Baki PA, El-Sherei MM, Khaleel AE, Motaal AA, Abdallah HI. Aquaretic activity of *Solidago canadensis* L. cultivated in Egypt and determination of the most bioactive fraction. *JPR*. 2019;18(2):922–37. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.2390>
21. Islam M, Al-Amin M, Siddiqi MMA, Akter S, Haque MM, Sultana N, et al. Isolation of quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside from the leaves of *Azadirachta indica* and antimicrobial and cytotoxic screening of the crude extracts. *Dhaka Univ J Sci*. 2012;60(1):11–4. <https://doi.org/10.3329/dujs.v60i1.10328>
22. Bylka W, Matlawska I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Pol Pharm*. 2001;58(1):69–72. PMID: 11370291
23. Colombo ML, Bugatti C, Mossa A, Pescalli N, Piazoni L, Pezzoni G, et al. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Farmaco*. 2001;56(5–7):403–9. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01121-1](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01121-1)

Вклад авторов. В.И. Топоркова – выделение и анализ индивидуальных соединений из лекарственного растительного сырья; А.О. Понкратова – выделение и анализ индивидуальных соединений из лекарственного растительного сырья; А.К. Уэйли – сбор и интерпретация результатов ЯМР-спектроскопии; В.Г. Лужанин – написание текста рукописи; М.Ю. Гончаров – идея, планирование исследования, ответственность за все аспекты работы. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарности. ЯМР-данные были получены с использованием оборудования ресурсного центра «Магнитно-резонансные методы исследования» Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. Valeria I. Toporkova— isolation and analysis of individual compounds from the herbal substance; Anastasiia O. Ponkratova— isolation and analysis of individual compounds from the herbal substance; Andrei K. Whaley—obtaining and interpretation of NMR data; Vladimir G. Luzhanin— writing of the paper; Mikhail Yu. Goncharov—elaboration of the idea of the study, planning of the study, carrying responsibility for all aspects of the study. All the authors took part in the discussion of the results.

Acknowledgements. NMR data were obtained using the equipment of the Magnetic Resonance Research Centre of St. Petersburg State University.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Топоркова Валерия Игоревна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5985-5156>
toporkova.valeriya@pharminnotech.com

Понкратова Анастасия Олеговна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>
anastasiya.ponkratova@yandex.ru

Уэйли Андрей Кеннет.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>
9968639@gmail.com

Лужанин Владимир Геннадьевич, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>
vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

Гончаров Михаил Юрьевич, д-р биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>
mikhail.goncharov@pharminnotech.com

Valeria I. Toporkova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5985-5156>
toporkova.valeriya@pharminnotech.com

Anastasiia O. Ponkratova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>
anastasiya.ponkratova@yandex.ru

Andrei K. Whaley.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>
9968639@gmail.com

Vladimir G. Luzhanin, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>
vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

Mikhail Yu. Goncharov, Dr. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>
mikhail.goncharov@pharminnotech.com

Статья поступила 01.12.2021

После доработки 26.01.2022

Принята к печати 04.03.2022

Article was received 1 December 2021

Revised 26 January 2022

Accepted for publication 4 March 2022



В.М. Шукин ✉ 
Н.Е. Кузьмина 
Ю.Н. Швецова 
А.И. Лутцева 

Особенности разработки и валидации методик определения элементных токсикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

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

✉ Шукин Виктор Михайлович; schukin@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Изменение подхода к контролю качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП) по содержанию тяжелых металлов с суммарного определения калориметрическим методом на селективный анализ спектральными методами привело к тому, что многие производители этого вида лекарственных средств не смогли учесть новые требования при составлении регистрационных досье. Представляемые на экспертизу методики нуждаются в уточнении, валидационные протоколы не содержат всех необходимых данных. **Цель работы:** предложить производителям ЛРС и ЛРП рекомендации по выбору методов анализа, материалов и реактивов, способов минерализации органической матрицы, основных валидационных параметров методики, а также по проведению валидации при определении элементных токсикантов и по оформлению раздела «Тяжелые металлы и мышьяк» в нормативной документации на лекарственные средства. **Материалы и методы:** исследование основано на анализе и обобщении данных научной литературы, требований российских и зарубежных фармакопей, методических рекомендаций и стандартов по инструментальным методам анализа, а также на собственном опыте проведения элементного анализа различных видов ЛРС и ЛРП. **Результаты:** представлены рекомендации по выбору условий минерализации пробы для количественного определения элементных примесей в биологических объектах, обоснованы требования к реактивам, используемым материалам и оборудованию. Проведен сравнительный анализ используемых методов элементного анализа. Показано, что основные ошибки производителей связаны с игнорированием влияния органической матрицы на результат измерения и отсутствием согласованности между определяемой концентрацией элементной примеси и используемым диапазоном калибровочной кривой. Приведены критерии приемлемости для валидационных параметров методик определения тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП. **Выводы:** использование стандартных образцов, в которых тяжелые металлы находятся в виде неорганических солей и не связаны с органическими соединениями, для анализа ЛРС и ЛРП следует признать некорректным. Для ряда валидационных параметров при отсутствии в отечественной фармакопее критериев их приемлемости рекомендуется использовать критерии, указанные в Европейской фармакопее и Фармакопее США.

Ключевые слова: тяжелые металлы; минерализация; валидация; специфичность; открываемость; линейность; правильность; прецизионность; критерии приемлемости

Для цитирования: Шукин В.М., Кузьмина Н.Е., Швецова Ю.Н., Лутцева А.И. Особенности разработки и валидации методик определения элементных токсикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(1):65–78. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-65-78>

V.M. Shchukin ✉ 
N.E. Kuz'mina 
Yu.N. Shvetsova 
A.I. Luttseva 

Development and Validation of Procedures for Determination of Elemental Toxicants in Herbal Substances and Herbal Medicinal Products

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

✉ **Victor M. Shchukin;** schukin@expmed.ru

ABSTRACT

When the approach to quality control of herbal substances (HSs) and herbal medicinal products (HMPs) changed from determination of the total content of heavy metals by calorimetry to selective determination by spectrometric techniques, many manufacturers of such products failed to meet the new requirements in their registration dossiers. Test procedures submitted by manufacturers often need to be clarified, and validation protocols often lack data. **The aim of the study** was to provide recommendations to HS and HMP manufacturers on the choice of test methods, materials, reagents, methods of organic matrix mineralisation, and main validation parameters, as well as recommendations on validation of the procedure for elemental toxicants determination, and preparation of the “Heavy metals and arsenic” part of the regulatory submission. **Materials and methods:** the study included analysis and systematisation of scientific literature, requirements of the Russian and foreign pharmacopoeias, guidelines, manuals on instrumental methods of analysis, and first-hand experience in elemental analysis of various types of HSs and HMPs. **Results:** the authors formulated recommendations on the choice of sample mineralisation conditions for quantification of elemental impurities in biological products, and substantiated requirements for the reagents, materials, and equipment. The paper compares different methods of elemental analysis. It was demonstrated that the main mistakes made by manufacturers stem from disregard to the organic matrix effect on the measurement results and lack of agreement between the impurity concentration being determined and the range of the calibration curve used. The paper gives acceptance criteria for validation parameters of test procedures for heavy metals and arsenic determination in HSs and HMPs. **Conclusions:** it is not correct to use reference standards containing heavy metals as inorganic salts not bound to organic compounds, for HS and HMP analysis. The criteria given in the European Pharmacopoeia and the United State Pharmacopoeia can be used for a number of validation parameters, when they are not included in the Russian Pharmacopoeia.

Key words: heavy metals; mineralisation; validation; specificity; recovery; linearity; accuracy; precision; acceptance criteria

For citation: Shchukin V.M., Kuz'mina N.E., Shvetsova Yu.N., Luttseva A.I. Development and validation of procedures for determination of elemental toxicants in herbal substances and herbal medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Reguljatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2022;12(1):65–78. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-65-78>

Введение

Разработка новых лекарственных средств синтетического происхождения не снижает интереса к использованию в медицинской практике лекарственных растений и продуктов на их основе. Растительное сырье перерабатывают для получения таких препаратов, как эфирное масло, жирное масло, брикеты, порошки и фильтр-пакеты, экстракты, настойки, эликсиры, бальзамы, лекарственные препараты на основе индивидуальных биологически активных соединений [1]. Сегмент лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на российском фармацевтическом рынке постоянно растет. Среди общего количества зарегистрированных лекарственных средств от 10 до 25% препаратов (по разным оценкам) производится из лекарственного растительного сырья (ЛРС) [2, 3]. Кроме того, экстракты, получаемые из ЛРС, также применяют для производства косметической продукции и получения биологически активных веществ [4].

Развитие рынка лекарственных препаратов растительного происхождения и разработка новых, более совершенных аналитических методов приводят к отказу от устаревших методик контроля качества ЛРС и ЛРП¹ [5]. В первую очередь это касается замены методик суммарного определения содержания тяжелых металлов в ЛРС и ЛРП калориметрическим методом на методики их селективного определения спектральными методами (атомно-абсорбционной спектроскопией (ААС), атомно-эмиссионной спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС), масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС)). В 2015 г. в общей фармакопейной статье ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) впервые были введены нормы содержания мышьяка, кадмия, свинца и ртути в ЛРС и ЛРП

и приведены примеры методик селективного определения этих контаминантов.

Изменение подхода к определению содержания тяжелых металлов в ЛРС и ЛРП (с суммарного на селективный) вызвало необходимость разрабатывать и валидировать методики селективного определения тяжелых металлов и мышьяка в конкретных видах выпускаемой продукции. Для многих из производителей ЛРС и ЛРП это был новый опыт, что послужило причиной появления многочисленных ошибок в составляемых ими регистрационных досье. Ситуация осложнилась тем, что рекомендации различных отечественных и зарубежных нормативных документов по разработке и валидации аналитических методик количественного определения элементных токсикантов в ЛРС и ЛРП² носят общий характер и по ряду аспектов не гармонизированы между собой. Как следствие, многие производители этого вида лекарственных средств не смогли учесть новые требования в своей нормативной документации (НД). В НД на ЛРС и ЛРП, представляемой на экспертизу, часто отсутствует необходимая для проведения анализа информация, а изложение методики нуждается в уточнении. Валидационная часть регистрационного досье на разработанные методики также не содержит всех необходимых данных, а использованные критерии оценки пригодности разработанных методик не соответствуют существующим рекомендациям³.

Цель работы – предложить производителям ЛРС и ЛРП рекомендации по выбору методов анализа, материалов и реактивов, способов минерализации органической матрицы, основных валидационных параметров методики, а также по проведению валидации при определении элементных токсикантов и по оформлению раздела «Тяжелые металлы и мышьяк» в нормативной документации на лекарственные средства.

¹ Elemental impurities: standards-setting record. United States Pharmacopeial Convention; 2012. https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/2012-12-20_elemental_impurities_standards-setting_record-full.pdf

² Быковский СН, ред. Руководство по экспериментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов. М.: Перо; 2014.
Береговых ВВ, ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: Литтерра; 2008.
Articles of botanical origin. General chapters 561. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.
General monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³ Там же.

Материалы и методы

Рекомендации составлены на основе собственного опыта проведения элементного анализа различных видов ЛРС и ЛРП [6, 7], обобщения данных научной литературы, требований ГФ РФ XIV изд., Фармакопеи США (USP), Европейской фармакопеи (Ph. Eur.), Фармакопеи Евразийского экономического союза (ЕАЭС), российских и зарубежных методических рекомендаций и стандартов по инструментальным методам анализа⁴, а также в результате анализа и обобщения ошибок, встречающихся при оформлении валидационных протоколов.

Результаты и обсуждение

Основными этапами анализа ЛРС и ЛРП являются: отбор проб, пробоподготовка, анализ испытуемых растворов, обработка результатов испытаний с оценкой их соответствия требованиям нормативной документации. Наиболее распространенным способом введения испытуемых образцов в атомизатор является распыление раствора, поэтому твердые образцы должны быть растворены перед началом анализа. Самым трудозатратным и вносящим наибольшую погрешность в результат измерения является этап пробоподготовки, так как максимально полный перевод элементов из органической матрицы ЛРС и ЛРП в испытуемый раствор для анализа (минерализация) сопряжен с определенными трудностями [7]. Элементы в этих образцах могут присутствовать в виде элементоорганических соединений, и для их извлечения, а также для разрушения органической матрицы образца требуется применять жесткие условия разложения и использовать сильные окислители⁵.

Риск потери целевых элементов из-за использования жестких условий разложения требует использования закрытых систем пробоподготовки [8, 9]. При использовании закрытых систем пробоподготовки (микроволновой или автоклавной) в проекте НД следует указывать параметры проведения разложения: время проведения каждого из этапов, температуру раствора. Указание

мощности обычно избыточно, так как в современных системах данный параметр подбирается оборудованием автоматически в зависимости от требуемой температуры. При использовании открытых систем необходимо указывать степень разложения и качественный показатель каждого этапа: цвет золы, степень упаривания раствора (досуха, до влажных солей и т.д.).

Так как матрица ЛРС и ЛРП содержит значительное количество органических и неорганических соединений, возникает проблема появления различного рода наложения сигналов (изобарные, полиатомные, многозарядные) [10] и влияния матричного эффекта [11]. Добавление к испытуемому образцу большого количества окислителей для минерализации пробы также увеличивает общую засоленность раствора, из-за чего усиливается матричный эффект. Кроме того, существует риск внесения определяемых элементов вместе с используемыми реактивами и лабораторной посудой, поэтому нужно использовать особо чистые окислители и по возможности уменьшать их количество.

При анализе следовых количеств токсикантов лабораторная посуда должна быть специально подготовлена, так как примеси могут быть адсорбированы на внутренней поверхности сосуда после анализа предыдущей пробы. Так как потери и загрязнения, связанные с используемой посудой, трудно предсказать и оценить, необходимо обращать особое внимание на ее очистку, хранение и учитывать предысторию использования [12]. Чтобы уменьшить загрязнения, необходимо использовать посуду из химически инертных материалов (полипропилен и полиэтилен), а также очищать ее с помощью растворов чистых азотной и (или) соляной кислот (1–10%) и воды очищенной, использование проточной воды для ополаскивания посуды не рекомендуется. Использование более концентрированной кислоты приводит к выщелачиванию поверхности стеклянной посуды. По возможности необходимо использовать одноразовую посуду.

⁴ ГОСТ 26929-94. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов. М.: ИПК Издательство стандартов; 2002.

МУК 4.1.1482-03. 4.1. Методы контроля. Химические факторы. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, поливитаминных препаратах с микроэлементами, в биологически активных добавках к пище и в сырье для их изготовления методом атомной эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. М.: Минздрав России; 2003.

МУК 4.1.985-00. Определение содержания токсичных элементов в пищевых продуктах и продовольственном сырье. Методика автоклавной пробоподготовки. М.: Минздрав России; 2000.

SW-846 Test Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. US EPA; 1996.

⁵ Там же.

Концентрация определяемых элементов в используемой воде и реактивах должна быть настолько низкой, чтобы не влиять на результат анализа. Чистота реактивов квалификации «для анализа», как правило, недостаточна и не рекомендована для реактивов, применяющихся для спектрального анализа, согласно действующим ОФС и ГОСТ. Следует либо приобретать реактивы лучшего качества, либо применять в качестве альтернативы дальнейшую очистку реактивов в лаборатории. Общие требования к реактивам, оборудованию и условиям проведения элементных анализов приведены в ГОСТ EN 13804-2013 «Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Критерии эффективности методик выполнения измерений, общие положения и способы подготовки проб», а также методических указаний⁶ для анализа образцов со сложной органической матрицей. В большинстве случаев отечественные производители ЛРП не учитывают квалификацию растворителей при разработке методик оценки количества элементных примесей в препарате и не указывают эту информацию при написании соответствующего раздела НД. Это может привести к получению завышенных результатов, особенно при определении ртути, содержание которой нормируется на относительно низком уровне. Очистка реактивов от тяжелых металлов требует дополнительных трудозатрат, но они окупаются за счет качества проводимых анализов.

Сравнительный анализ требований российской и зарубежных фармакопей к пробоподготовке ЛРС и ЛРП (способам минерализации, используемым реактивам) и методам элементного анализа приведен в таблице 1. Данные требования дополнены рекомендациями Агентства по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency, EPA), являющегося одним из основных мировых разработчиков методик анализа биологических объектов. Следует отметить, что согласно требованиям ГФ РФ⁷ в отличие от требований Ph. Eur. и USP разложение ЛРС и ЛРП допускается проводить в открытых сосудах (озоление в муфельной

печи и мокрое озоление при нагревании), хотя данные методы пробоподготовки ведут к существенной потере определяемых элементов [13, 14]. В Ph. Eur. и USP приведены требования использовать исключительно закрытые системы разложения. Согласно USP рекомендуется наряду с селективным определением содержания элементов также проводить селективное определение различных форм элементов (например, органического и неорганического мышьяка [15], общей ртути и метилртути)⁸.

Согласно требованиям ведущих фармакопей предусматривается проведение минерализации ЛРС и ЛРП с использованием сильных окислителей. Одно из требований к разрабатываемой методике – сокращение перечня используемых реактивов и упрощение процесса пробоподготовки. Наиболее удобным в использовании окислителем является азотная кислота. Для нее легко достижима высокая чистота (очистка производится в лабораторных условиях путем перегонки). Азотная кислота не является прекурсором наркотических средств (не требует специального учета и условий хранения), она малолетучая, имеет длительный срок хранения, соли азотной кислоты легко растворимы в воде. В процессе анализа с использованием индуктивно-связанной плазмы азотная кислота не образует соединений, вызывающих полиатомные наложения сигналов, что делает ее наиболее пригодным реактивом для минерализации проб. Во многих случаях для достижения приемлемой полноты извлечения элементов-токсикантов достаточно использования только концентрированной азотной кислоты [16]. Для минерализации сложных биологических объектов иногда требуется использование смеси азотной и соляных кислот [17], а также добавление пероксида водорода⁹.

Соляная кислота является прекурсором наркотических веществ, летуча, может образовывать газообразный хлор, часть ее солей трудно-растворимы, хлориды, образующиеся в процессе анализа с использованием масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, являются

⁶ МУК 4.1.1482-03. 4.1. Методы контроля. Химические факторы. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, поливитаминных препаратах с микроэлементами, в биологически активных добавках к пище и в сырье для их изготовления методом атомной эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. М.; Минздрав России; 2003.

⁷ ОФС.1.5.3.009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁸ Articles of botanical origin. General chapters 561. United State Pharmacopoeia USP 43–NF38. 2019.

⁹ Environmental Protection Agency (EPA). Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. EPA SW-846, Revision 3. Washington DC; 2004.

Таблица 1. Требования фармакопей и Агентства по охране окружающей среды США по проведению анализа на содержание тяжелых металлов и мышьяка в лекарственных растительных препаратах и лекарственном растительном сырье

Table 1. Pharmacopoeia and United States Environmental Protection Agency requirements for determination of heavy metals and arsenic in herbal substances and herbal medicinal products

Условия проведения анализа <i>Test conditions</i>	Государственная фармакопея Российской Федерации ¹⁰ <i>State Pharmacopoeia of the Russian Federation¹⁰</i>	Европейская фармакопея ¹¹ <i>European pharmacopoeia¹¹</i>	Фармакопея США ¹² <i>United States Pharmacopoeia¹²</i>	Рекомендации Агентства по охране окружающей среды США ¹³ <i>United States Environmental Protection Agency¹³</i>
Минерализация <i>Mineralisation</i>	Озоление в муфельной печи, открытые сосуды; мокрое озоление при нагревании, открытые сосуды; автоклав; микроволновое разложение <i>Muffle furnace ignition, open vessels; Wet ignition with heating, open vessels; Autoclave; Microwave digestion</i>	Микроволновое разложение, закрытые сосуды <i>Microwave digestion, closed vessels</i>	Микроволновое разложение, закрытые сосуды (для общего мышьяка и ртути); экстракция и анализ спектральными методами (неорганический мышьяк и метилртуть) <i>Microwave digestion, closed vessels (for total arsenic and mercury); Extraction and spectrometric analysis (inorganic arsenic and methylmercury)</i>	Микроволновое разложение, закрытые сосуды <i>Microwave digestion, closed vessels</i>
Реагенты <i>Reagents</i>	HF H ₂ SO ₄ + HCl HNO ₃ + HCl HNO ₃ + (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ H ₂ SO ₄ + HNO ₃ HNO ₃ + HCl концентрированные кислоты <i>Concentrated acids</i>	HNO ₃ + HCl HNO ₃ + H ₂ O	Концентрированные кислоты <i>Concentrated acids</i>	HNO ₃ + HF HNO ₃ + HF + HCl HNO ₃ + HF + HCl + H ₂ O ₂
Методы анализа <i>Test methods</i>	ААС (пламя и графитовая печь); ИСП-АЭС; ИСП-МС <i>AAS (flame and graphite furnace); ICP-AES; ICP-MS</i>	ААС (пламя и графитовая печь); ИСП-АЭС; ИСП-МС <i>AAS (flame and graphite furnace); ICP-AES; ICP-MS</i>	ИСП-АЭС; ИСП-МС <i>ICP-AES; ICP-MS</i>	ААС (пламя и графитовая печь); ИСП-АЭС; ИСП-МС <i>AAS (flame and graphite furnace); ICP-AES; ICP-MS</i>

Примечание. ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия; ИСП-АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой; ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.

Note. AAS—atomic absorption spectrometry; ICP-AES—inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry; ICP-MS—inductively coupled plasma-mass spectrometry.

источником полиатомных наложений сигналов, которые заметно мешают определению мышьяка при данном способе анализа¹⁴.

Серная кислота также является прекурсором, многие ее соли труднорастворимы или нерастворимы (например, сульфат свинца). Серная кислота может разрушать поверхности тефлоновых виал для микроволнового разложения.

Хлорная кислота взрывоопасна, неустойчива при хранении, при ее использовании в анализе с индуктивно-связанной плазмой возможно образование хлоридов.

Фтористоводородная кислота используется в основном для разложения силикатов и чаще всего не требуется при анализе биологических объектов, так как ее использование практически

¹⁰ ОФС.1.5.3.009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

¹¹ General monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations European Pharmacopoeia the 10th ed., Supplement 10.5. 2019. <http://www.edgm.eu>

¹² Elemental impurities—procedures. General chapters 233. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019. Plasma spectrochemistry. General chapters 730. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

¹³ Environmental Protection Agency (EPA). Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. EPA SW-846, Revision 3. Washington DC; 2004.

¹⁴ Memorandum regarding use of hydrochloric acid (HCl) in Digests for inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/digestate_hci_1.pdf

не влияет на извлечение нормируемых элементов [18]. Использование плавиковой кислоты требует специального аппаратного оснащения спектрометров, так как даже слабые ее растворы разрушают систему подачи пробы.

Пероксид водорода имеет малый срок годности и требует специальных условий для хранения. Его использование целесообразно при необходимости большого количества окислителя без заметного увеличения кислотности испытуемого раствора [19]. В некоторых случаях при минерализации чистых субстанций возможно применение только пероксида водорода в условиях повышенной температуры и давления [20].

Для снижения общей засоленности испытуемых растворов, удешевления анализа и соответствия требованиям «зеленой» химии необходимо уменьшать количество используемых реактивов и общую кислотность образующихся испытуемых растворов¹⁵.

В проекте НД необходимо указывать все используемые при пробоподготовке и приготовлении калибровочных растворов реактивы, их чистоту и производителя (с указанием каталожных номеров), а также предусматривать возможность использования реактивов аналогичного качества других производителей.

Согласно требованиям ГФ РФ и Ph. Eur. рекомендовано использовать для определения содержания тяжелых металлов спектральные методы: ААС, ИСП-АЭС и ИСП-МС. Следует отметить, что с помощью ААС невозможно проводить одновременное селективное определение ртути, свинца, кадмия и мышьяка (для кадмия и свинца необходимо использовать пламенный метод атомизации, для мышьяка и ртути гидридную приставку или отдельный анализатор, так как данный метод обладает высоким пределом количественного определения (ПКО) и высоким пределом обнаружения (ПО)) [21], поэтому

согласно USP¹⁶ не рекомендуется использовать этот метод для анализа элементных токсикантов. Однако отечественные производители предпочитают использовать именно ААС по причине наименьшей стоимости оборудования.

Определение содержания изучаемого элемента проводят по калибровочной кривой, построенной с помощью стандартных растворов известной концентрации или с использованием метода стандартных добавок. При построении калибровочной кривой необходимо учитывать диапазон применения методики¹⁷. Одна из распространенных ошибок – отсутствие согласованности между номинальной концентрацией определяемой примеси и используемым диапазоном калибровочной кривой (ожидаемое значение концентрации определяемого элемента в испытуемом растворе находится вне диапазона концентраций стандартных растворов). Другая крайность – выбор излишне широкого диапазона калибровочной кривой. Следует помнить, что его увеличение и использование для построения калибровочной кривой добавочного количества точек ведет к уменьшению точности анализа в области низких калибровочных концентраций¹⁸, а также повышает трудозатраты, расход реактивов и загрязняет оборудование (особенно в случае анализа содержания ртути)¹⁹. Рекомендуется использовать 3–5 точек калибровки, включая холостой раствор. Для нивелирования матричного эффекта при применении метода калибровочной кривой часто требуется использование внутреннего стандарта, выбираемого индивидуально для каждого определяемого элемента [22–24]. Следует отметить, что метод стандартных добавок позволяет более полно учитывать влияние органической матрицы по сравнению с методом калибровочной кривой [25].

При описании методики в проекте НД не обязательно требовать проведения калибровки, используемой для валидационных исследований. Достаточно трех точек калибровки, находящихся

¹⁵ 12 Principles of green chemistry. ACS Green Chemistry Institute. <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html>

¹⁶ Digest of comments received on the stimuli article “General chapter on inorganic impurities: heavy metals”. Published in Pharmacopoeial Forum 34(5) April 22, 2009.

¹⁷ ОФС.1.2.1.1.0004.15 Атомно-эмиссионная спектрометрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

ОФС.1.2.1.1.0005.18 Атомно-абсорбционная спектроскопия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹⁸ White paper. Sensitivity, background, noise, and calibration in atomic spectroscopy: effects on accuracy and detection limits. Perkin Elmer Inc. Shelton CT; 2017.

¹⁹ Gray PJ, Mindak WR, Cheng J. Inductively coupled plasma-mass spectrometric determination of arsenic, cadmium, chromium, lead, mercury, and other elements in food using microwave assisted digestion. Version 1.1. Elemental analysis manual. FDA; 2015.

в доказанном диапазоне линейности методики. В качестве критерия приемлемости методики необходимо указывать коэффициент корреляции, получаемый при построении калибровочной кривой (обычно $r = 0,99$).

В каждом НД необходимо приводить формулу расчета концентраций определяемых элементов в препарате с использованием концентраций испытуемых растворов, определенных по калибровочной кривой и с учетом концентраций целевых элементов в холостом растворе. Также в расчетной формуле необходимо учитывать степень разбавления и навеску испытуемого образца.

Основные требования к разработке методик определения тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП приведены в ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ РФ XIV изд., а также в руководстве по инструментальным методам анализа²⁰. Общие требования к валидации аналитических методик количественного определения примесей приведены в Руководстве ЕАЭС²¹, а также в соответствующих статьях ГФ РФ XIV изд.²² Многие вопросы применения валидационных параметров рассмотрены в отечественных и зарубежных рекомендациях²³. Следует отметить, что в Фармакопее ЕАЭС (ОФС.2.4.27 «Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах») закреплено требование обязательной валидации производителем фармакопейных методик количественного определения содержания тяжелых металлов в ЛРС и ЛРП спектральными методами с учетом используемого оборудования

для проведения пробоподготовки и элементного анализа. Такое же требование предусмотрено и в ГФ РФ²⁴.

Перед началом выполнения испытаний на чистоту лекарственного средства спектральными методами необходимо провести испытание на пригодность системы. Основными критериями приемлемости являются: отсутствие видимых механических примесей (для раствора), измеренная концентрация стандартного раствора элемента, находящаяся в пределах диапазона концентраций используемой калибровочной кривой, не должна отличаться от фактической концентрации более чем на 20% (для оборудования)²⁵.

Основные валидационные параметры методик определения содержания тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП спектральными методами и критерии их приемлемости приведены в таблице 2.

Важным валидационным параметром аналитической методики является ее специфичность. С помощью методики должно быть возможно однозначно определять и оценивать количество элемента в присутствии всех возможных влияющих компонентов, в том числе других тяжелых металлов, элементов и соединений матричного раствора и других источников помех. Специфичность спектральных методов подтверждается путем регистрации аналитического сигнала от стандартного образца определяемого элемента в испытуемом растворе. Специфичность необходимо подтверждать при валидации каждой конкретной методики определения элементных примесей, несмотря на то что данная методика приведена в фармакопее²⁶.

²⁰ Быковский СН, ред. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов. М.: Перо; 2014.

²¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

²² ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

²³ Юргель НВ, ред. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). М.: Спорт и культура–2000; 2007.

Эрмер Й, Миллер Дж. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучшей практики. М.: ВИАЛЕК; 2013.

²⁴ ОФС.1.5.3.0009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

²⁵ ОФС.2.1.4.21. Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза. General monograph 2.4.20. Determination of elemental impurities. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

²⁶ WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-seventh report. Geneva: WHO; 2013.

Таблица 2. Критерии приемлемости валидационных параметров аналитических методик определения тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах**Table 2.** Acceptance criteria for validation parameters of test procedures for determination of heavy metals and arsenic in herbal substances and herbal medicinal products

Параметр <i>Parameter</i>	Критерии приемлемости <i>Acceptance criteria</i>		
	Государственная фармакопея Российской Федерации ²⁷ <i>State Pharmacopoeia of the Russian Federation²⁷</i>	Европейская фармакопея ²⁸ и Фармакопея Союза ²⁹ <i>European pharmacopoeia²⁸ and Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union²⁹</i>	Фармакопея США ³⁰ <i>United States Pharmacopoeia³⁰</i>
Специфичность <i>Specificity</i>	Соответствие требованию для правильности определения содержания элемента <i>Demonstrated by complying with the accuracy requirement</i>		
Открываемость <i>Recovery</i>	Критерий отсутствует <i>No criteria</i>	70–150% от истинного для среднего из трех измерений <i>70–150% for the mean of three replicates at each concentration</i>	70–150% от истинного для среднего из трех измерений <i>70–150% for the mean of three replicates at each concentration</i>
Предел количественного определения <i>Limit of quantification</i>	10×сигнал/шум <i>10×signal/noise</i>	Ниже предельного значения по спецификации (50% от предельно допустимой концентрации) <i>Below the specification limit (50% of the maximum admissible concentration)</i>	Ниже предельного значения по спецификации (50% от предельно допустимой концентрации) <i>Below the specification limit (50% of the maximum admissible concentration)</i>
Диапазон применения <i>Range</i>	До 120% от предела количественного определения (или предела обнаружения) <i>Up to 120% of the limit of quantification (or limit of detection)</i>	В пределах линейного диапазона методики <i>Within the linear range of the method</i>	50–150% для каждого определяемого элемента <i>50–150% for each target element</i>
Линейность <i>Linearity</i>	Коэффициент корреляции $\geq 0,990$ ($\geq 0,9$ для следовых количеств) <i>Correlation coefficient ≥ 0.990 (≥ 0.9 for trace amounts)</i>	Коэффициент корреляции $\geq 0,99$ <i>Correlation coefficient ≥ 0.99</i>	Коэффициент корреляции $\geq 0,995$ <i>Correlation coefficient ≥ 0.995</i>
Правильность <i>Accuracy</i>	Значения, принимаемые за истинные, должны лежать внутри доверительного интервала <i>Values accepted as true must lie within the confidence interval</i>	Выполнение требований для открываемости <i>Demonstrated by complying with the Recovery requirement</i>	Выполнение требований для открываемости <i>Demonstrated by complying with the Recovery requirement</i>
Повторяемость (Сходимость) <i>Repeatability</i>	$RSD \leq 1\%$	$RSD \leq 20\%$ (0,01–1 мг/кг) $RSD \leq 10\%$ (>1 мг/кг) $RSD \leq 20\%$ (0,01–1 мг/кг) $RSD \leq 10\%$ (>1 мг/кг)	$RSD \leq 20\%$
Внутрилабораторная прецизионность <i>Intermediate precision</i>	$RSD \leq 1\%$	$RSD \leq 32\%$ (0,01–1 мг/кг) $RSD \leq 16\%$ (>1 мг/кг) $RSD \leq 32\%$ (0,01–1 мг/кг) $RSD \leq 16\%$ (>0.1 мг/кг)	$RSD \leq 25\%$

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение.**Note.** RSD—relative standard deviation.

²⁷ ОФС.1.5.3.0009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.
ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.
ОФС.1.2.1.1.0004.15. Атомно-эмиссионная спектрометрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

²⁸ General monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

²⁹ ОФС.2.1.4.21. Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза.

³⁰ Elemental impurities—procedures. General chapters 233. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.
Plasma spectrochemistry. General chapters 730. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

Одним из важнейших требований, предъявляемых к аналитической методике, является обеспечение полноты извлечения исследуемых элементов, которая характеризуется параметром «открываемость». Самым простым способом определения открываемости является внесение в ЛРП рассчитанного количества стандартных образцов (СО) тяжелых металлов для получения модельной смеси и сравнение этого количества с найденным в растворе после минерализации [16]. Этот способ не является полностью корректным (хотя и допускается), так как тяжелые металлы в СО находятся в легко доступной форме и не связаны с органическими соединениями. Более корректным является использование СО растительного сырья, аттестованных по содержанию тяжелых металлов. Желательно, чтобы СО содержал все нормируемые элементы в концентрациях, близких к установленному спецификацией предельному значению, но наземные высшие растения обычно не накапливают столько элементных токсикантов. Ртуть в количествах, близких к нормируемым, содержится в основном в морской биоте. В связи с этим для качественной валидации методики требуется использовать несколько разных СО.

Открываемость доказывают не менее чем на трех образцах, содержащих определяемый элемент в диапазоне 50–150% от установленного спецификацией предельного значения³¹. В соответствии с требованиями Ph. Eur. и USP открываемость должна составлять 70–150% от истинного для среднего из трех измерений³². В отечественной фармакопее требования к открываемости отсутствуют.

Для спектральных методов ПКО является количественной характеристикой спектрометра, которая позволяет оценить чувствительность спектрометра при анализе того или иного элемента и оценить пригодность прибора для использования при анализе содержания элементных токсикантов в ЛРС и ЛРП. В соответствии с ГФ РФ XIV изд. для инструментальных методов (включая спектральные) ПКО принято определять как величину соотношения «сигнал/шум»

(10:1). Ph. Eur. и USP используют другой подход, регламентирующий величину ПКО в пределе 50% от установленного спецификацией допустимого содержания элемента.

Диапазон применения (аналитическая область) методики – это интервал между наибольшей и наименьшей концентрациями (количествами) определяемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности. В соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV изд. верхняя граница диапазона применения методики составляет 120%³³ от установленного спецификацией предельно допустимого содержания примеси, нижняя граница диапазона – значение ПКО (или ПО) элементной примеси.

Линейность методики является одним из необходимых валидационных параметров, требующих подтверждения. Линейность методики – это способность (в заданном диапазоне) получать результаты теста, которые прямо пропорциональны концентрации (количеству) аналита в образце. Согласно требованиям ГФ РФ XIV изд. и рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)³⁴ для подтверждения линейности используют не менее пяти образцов с различными концентрациями определяемых элементов. Важно отметить, что при валидации методики производители часто используют водные растворы стандартных образцов определяемых элементов. Данный способ служит лишь для подтверждения работоспособности оборудования и не может применяться для подтверждения линейности методики, так как не учитывает матричные эффекты пробы. Линейность необходимо подтвердить, используя СО растительного сырья, аттестованный по содержанию тяжелых металлов, либо испытуемый раствор со внесенной добавкой определяемого элемента.

³¹ ОФС.2.1.4.21 Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза.

³² General monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019. Elemental impurities—procedures. General chapters 233. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

³³ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³⁴ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH harmonised tripartite guideline. Step 4. European Medicines Agency. London: EMA; 2005.

Допускается использование модельных смесей, компонентами которых являются ЛРС (ЛРП) и СО определяемых элементов³⁵. В валидационном протоколе должны быть указаны коэффициент корреляции, точка пересечения с осью Y и наклон калибровочной кривой. В соответствии с фармакопейными требованиями методика является пригодной, если соблюдено требование к величине коэффициента корреляции. При этом на калибровочном графике погрешности каждого калибровочного уровня должны быть распределены случайным образом³⁶.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. В соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV изд. методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике. Критерии приемлемости оценки правильности отдельно для ЛРС и ЛРП отсутствуют. В зарубежных фармакопеях правильность методик количественного определения элементных примесей в ЛРС и ЛРП выражают величиной открываемости в процентах. Согласно USP правильность оценивают по результатам количественного определения вещества, добавленного в известном количестве в анализируемый образец, или разностью между полученным средним и истинным/опорным значениями с учетом соответствующих доверительных интервалов³⁷. Согласно требованиям Ph. Eur. и Фармакопеи ЕАЭС рекомендовано для подтверждения правильности использовать СО, аттестованные по содержанию тяжелых металлов, либо проводить сравнение с результатами, полученными при определении открываемости, обязательно с учетом матри-

цы испытуемого образца³⁸. Согласно USP и Ph. Eur. в анализе элементных примесей правильность оценивают на уровнях 50, 100 и 150% от установленного спецификацией предельного значения.

Прецизионность на различных уровнях (сходимость и внутривлабораторную прецизионность) характеризуют величиной *RSD* — параметром, характеризующим точность измерения. Наиболее четко критерий приемлемости полученных значений *RSD* описан в Ph. Eur.: в соответствующей монографии приведена градация допустимого уровня *RSD* с учетом концентрации примеси (меньше или больше 1 ppm), отдельные значения приведены для ЛРС и ЛРП³⁹. В USP для спектральных методов элементного анализа даны максимально допустимые значения *RSD* с учетом типа лекарственного средства (субстанция или препарат) и с учетом количества определяемого вещества (основного действующего вещества в препарате или примеси)⁴⁰. ГФ РФ не предоставляет общих рекомендаций по критериям оценки приемлемости значений *RSD*, полученных при определении прецизионности аналитической методики. Однако в ОФС.1.2.1.1.0004.15 «Атомно-эмиссионная спектрометрия» ГФ РФ XIV изд. рекомендовано при количественных измерениях руководствоваться максимально допустимым значением *RSD* 1% без привязки к уровню прецизионности, типу лекарственного средства и уровню концентраций определяемого вещества. Следует отметить, что *RSD* = 1% в элементном анализе — труднодостижимая величина. Ее можно получить, если анализировать концентрированный одноэлементный водный раствор. Для реальных многокомпонентных смесей со сложной органической матрицей достигнуть такого значения *RSD* при определении прецизионности методики — невыполнимая задача. Значения *RSD*, предлагаемые фармакопей ЕАЭС и соответствующие

³⁵ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств». Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH harmonised tripartite guideline. Step 4. European Medicines Agency. London: EMA; 2005.

³⁶ Юргель НВ, ред. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). М.: Спорт и культура—2000; 2007.

³⁷ Validation of compendial procedures. General chapters 1225. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

³⁸ General monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019. ОФС.2.1.4.21 Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. Фармакопея Евразийского экономического союза.

³⁹ General monograph 2.4.27. Heavy metals analysis in herbal drugs and herbal drug preparations. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2019.

⁴⁰ Plasma spectrochemistry. General chapters 730. United State Pharmacopoeia USP43–NF38. Rockville, MD; 2019.

требованиям Ph. Eur. (табл. 2), лучше коррелируют с практикой элементного анализа биологических объектов [23], поэтому мы рекомендуем использовать их при разработке и валидации методик определения элементных примесей в ЛРС и ЛРП.

Выводы

На основе анализа требований российских и зарубежных фармакопей, методических указаний, стандартов и руководств по инструментальным методам анализа, а также учитывая собственный опыт проведения экспертиз качества ЛРС и ЛРП по показателю «Содержание тяжелых металлов и мышьяка», можно сделать следующие выводы:

1) разработка и валидация методик определения тяжелых металлов и мышьяка в ЛРС и ЛРП имеют свою специфику, обусловленную сложностью извлечения элементов из органической матрицы и ее существенным влиянием

на результат измерения. В связи с этим при разработке и валидации таких методик рекомендуется использовать стандартные образцы (СО) растительного сырья, аттестованные по содержанию тяжелых металлов. Применение СО, в которых тяжелые металлы находятся в легкодоступной форме (в виде неорганических солей) и не связаны с органическими соединениями, некорректно;

2) для использования представленных в отечественной и зарубежных фармакопеях методик определения содержания тяжелых металлов в ЛРС и ЛРП спектральными методами производителю обязательно требуется их предварительная валидация с учетом используемого оборудования для проведения пробоподготовки и элементного анализа;

3) для ряда валидационных параметров в ГФ РФ XIV изд. отсутствуют критерии их приемлемости. В этом случае рекомендуется использовать критерии, приведенные в зарубежных фармакопеях (Ph. Eur. и USP).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Русакова ОА, Ральченко ИВ, Герберт ИЯ, Вердиева СИ. Изучение аптечного ассортимента фитопрепаратов. *Фармация и фармакология*. 2015;3(6):54–9. [Rusakova OA, Ralchenko IV, Gerbert IYa, Verdieva SI. The study for the pharmacy range of herbal medicinal products. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy and Pharmacology* 2015;3(6):54–9 (In Russ.)] [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2015-3-6\(13\)-54-59](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2015-3-6(13)-54-59)
2. Филиппова И. Рынок растительных средств: проблемы, перспективы, приоритеты. *Ремедиум*. 2016;(7–8):15–6. [Filippova I. The market of herbal remedies: problems, prospects, priorities. *Remedium = Remedium*. 2016;(7–8):15–6 (In Russ.)]
3. Бойко НН, Бондарев АВ, Жилиякова ЕТ, Писарев ДИ, Новиков ОО. Фитопрепараты, анализ фармацевтического рынка Российской Федерации. *Научный результат*. 2017;3(4):30–8. [Boiko NN, Bondarev AV, Zhilyakova ET, Pisarev DI, Novikov OO. Phytodrugs, analysis of Russian Federation pharmaceutical market. *Naychny rezultat = Research Result*. 2017;3(4):30–8 (In Russ.)]
4. Евсеева СБ, Сысуйев ББ. Экстракты растительного сырья как компоненты косметических и наружных лекарственных средств: ассортимент продукции, особенности получения (обзор). *Фармация и фармакология*. 2016,4(3):4–37. [Evseeva SB, Syusuev BB. Plant raw material extracts as components of cosmetic products and formulations for topical administration: the product range, the production characteristics (review). *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy and Pharmacology*. 2016,4(3):4–37 (In Russ.)] <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-3-4-37>
5. Кузьмина НЕ, Шукин ВМ, Северинова ЕЮ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Изменение методов к нормированию содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(7):52–6. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2015-49-7-52-56> [Kuz'mina NE, Shchukin VM, Severinova EYu, Yashkir VA, Merkulov VA. Changes in the approaches to the normalization of heavy metal contents in medicinal herbs and herbal medicines (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(7):490–4] <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1312-y>
6. Шукин ВМ, Жигилей ЕС, Ерина АА, Швецова ЮН, Кузьмина НЕ, Лутцева АИ. Валидация методики определения ртути, свинца, кадмия и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах на его основе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(9):57–64. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2020-54-9-57-64> [Shchukin VM, Zhigilei ES, Erina AA, Shvetsova YuN, Kuz'mina NE, Luttseva AI. Validation of an ICP-MS method for the determination of mercury, lead, cadmium and arsenic in medicinal plants and related drug preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(9):968–76] <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02306-8>
7. Шукин ВМ, Северинова ЕЮ, Кузьмина НЕ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Усовершенствование методики пробоподготовки при количественном определении тяжелых металлов в цветках ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla*) методом ИСП-АЭС. *Успехи современного естествознания*. 2016;(6):53–8. [Shchukin VM, Severinova EYu, Kuz'mina NE, Yashkir VA, Merkulov VA. The improving method of sample preparation for the quantitative determination of heavy metals in the flowers

- of chamomile (*Matricaria chamomilla*) by ICP-AES. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Advances in Current Natural Sciences*. 2016;(6):53–8 (In Russ.)
8. Ellison SLR, Hardcastle WA. Causes of error in analytical chemistry: results of a web-based survey of proficiency testing participants. *Accred Qual Assur*. 2012;17(4):453–64. <https://doi.org/10.1007/s00769-012-0894-2>
 9. González A, Armenta S, Pastor A, de la Guardia M. Searching the most appropriate sample pretreatment for the elemental analysis of wines by inductively coupled plasma-based techniques. *J Agric Food Chem*. 2008;56(13):4943–54. <https://doi.org/10.1021/jf800286y>
 10. Altundag H, Tuzen M. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(11):2800–7. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.064>
 11. Лейкин АЮ, Якимович ПВ. Системы подавления спектральных интерференций в масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. *Журнал аналитической химии*. 2012;67(8):752–62. [Leykin AYU, Yakimovich PV. Systems for the suppression of spectral interferences for inductively coupled plasma mass-spectrometry. *J Anal Chem*. 2012;67(8):677–86] <https://doi.org/10.1134/S1061934812080047>
 12. Balam V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers. *Trends Anal Chem*. 2016;80(2):83–95. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.001>
 13. Коркина Д, Кларк-Карская Ю, Иванова А, Захарова А, Кузин А, Гринштейн И. Чистое рабочее место – комплексное решение проблемы загрязнений проб при проведении следового элементного анализа. *Аналитика*. 2016;(2):58–68. [Korkina D, Clark-Karska Yu, Ivanova A, Zakharova A, Kuzin A, Grinshtein I. A clean workplace – a comprehensive solution to the problem of sample contamination during trace element analysis. *Analitika = Analytics*. 2016;(2):58–68 (In Russ.)]
 14. Sun C, Liu H, Zhang B, Wei D, Huang L, Wu C. Profile differences of trace elements in vegetables and fruits resulting from various digestion procedures. In: *2011 International Conference on New Technology of Agricultural*. IEEE; 2011. P. 905–9. <https://doi.org/10.1109/icac.2011.5943935>
 15. Demirel S, Tuzen M, Saracoglu S, Soylak M. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. *J Hazard Mater*. 2008;152(3):1020–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.077>
 16. Щукин ВМ, Ерина АА, Лисман ЕС, Ваганова ОА. Проблемы нормирования мышьяка в бурых водорослях и лекарственных препаратах на их основе. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(3):167–72. [Shchukin VM, Erina AA, Lisman ES, Vaganova OA. Problems of establishing limits for arsenic content in brown algae and brown algae-containing medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ehkspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):167–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-167-172>
 17. Dimpe KM, Ngila JC, Mabuba N, Nomngongo PN. Evaluation of sample preparation methods for the detection of total metal content using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in wastewater and sludge. *Phys Chem Earth*. 2014;76–78:42–8. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2014.11.006>
 18. Das S, Ting YP. Evaluation of wet digestion methods for quantification of metal content in electronic scrap material. *Resources*. 2017;6(4):64. <https://doi.org/10.3390/resources6040064>
 19. Nóbrega JA, Pirola C, Fialho LL, Rota G, de Campos Jordão CE, Pollo F. Microwave-assisted digestion of organic samples: how simple can it become? *Talanta*. 2012;98:272–6. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.079>
 20. Anschau KF, Enders MS, Senger CM, Duarte FA, Dressler VL, Muller EI. A novel strategy for medical foods digestion and subsequent elemental determination using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Microchem J*. 2019;147:1055–60. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.009>
 21. Thomas R. Determining elemental impurities in pharmaceutical materials: how to choose the right technique. *Spectroscopy*. 2015;30(3):30–42.
 22. Carter JA, Barros AI, Nóbrega JA, Donati GL. Traditional calibration methods in atomic spectrometry and new calibration strategies for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Front Chem*. 2018;6:504. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00504>
 23. Masson P, Dalix T, Bussiere S. Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Comm Soil Sci Plant Anal*. 2010;41(3):231–43. <https://doi.org/10.1080/00103620903460757>
 24. Salit ML, Turk GC, Lindstrom AP, Butler TA, Beck CM, Norman B. Single-element solution comparisons with a high-performance inductively coupled plasma optical emission spectrometric method. *Anal Chem*. 2001;73(20):4821–9. <https://doi.org/10.1021/ac0155097>
 25. Chahrour O, Malone J, Collins M, Salmon V, Greenan C, Bombardier A, et al. Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient (API) according to USP <232>/<233>. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;145:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.045>

Вклад авторов. В.М. Щукин – идея исследования, анализ литературы, написание текста; Н.Е. Кузьмина – редактирование текста, формулировка выводов; Ю.Н. Швецова – анализ литературы, написание текста; А.И. Лутцева – ответственность за все аспекты работы.

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. Viktor M. Shchukin—elaboration of the idea of the study, literature review, writing of the original draft; Natalia E. Kuz'mina—editing of the text, formulation of the conclusions; Yulia N. Shvetsova—literature review, writing of the text; Anna I. Luttseva—coordination and supervision of the study.

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

Щукин Виктор Михайлович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9440-0950>
Schukin@expmed.ru

Кузьмина Наталия Евгеньевна, д-р хим. наук.

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

Швецова Юлия Николаевна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2125-6174>
shvetsovajn@expmed.ru

Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук.

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

Victor M. Shchukin.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9440-0950>
Schukin@expmed.ru

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

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

Yulia N. Shvetsova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2125-6174>
shvetsovajn@expmed.ru

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

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

Статья поступила 11.10.2021

После доработки 21.01.2022

Принята к печати 04.03.2022

Article was received 11 October 2021

Revised 21 January 2022

Accepted for publication 4 March 2022



В.В. Косенко 
Р.И. Ягудина  
О.А. Леднев,
В.Г. Серпик 

Анализ ассортимента лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации

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

✉ Ягудина Роза Исмаиловна; yagudina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Ассортимент лекарственных средств с каждым годом расширяется. **Цель работы:** анализ ассортимента лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации. **Материалы и методы:** анализ проведен на основе данных государственного реестра лекарственных средств по состоянию на июнь 2021 г. и действующих нормативных правовых актов, регламентирующих номенклатуру лекарственных средств. **Результаты:** представлены результаты анализа ассортимента зарегистрированных в Российской Федерации лекарственных средств по следующим параметрам: международные непатентованные наименования, торговые наименования, группы анатомо-терапевтической химической классификации, лекарственные формы, пути введения, первичная и вторичная упаковка, условия хранения, сроки годности. Проведенный нами анализ показал, что ассортимент лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации, насчитывает более 19 тыс. позиций, большинство из которых произведено в Российской Федерации. Преобладают противомикробные лекарственные препараты для системного использования, препараты для лечения заболеваний нервной и сердечно-сосудистой систем. Наиболее распространенными лекарственными формами являются таблетки, первичной упаковкой – флаконы. Среди режимов хранения преобладают температурные интервалы 15–25 и 2–8 °С. Около половины всех включенных в реестр лекарственных средств имеют срок годности 3 года. **Выводы:** представленная в статье информация может быть учтена при унификации подходов к ведению государственного реестра лекарственных средств, в том числе в процессе создания соответствующих справочников, а также использована разработчиками и производителями лекарственных средств при подготовке к экспертизе и регистрации лекарственных препаратов и формировании регистрационных досье.

Ключевые слова: ассортимент лекарственных средств; государственный реестр лекарственных средств; международное непатентованное наименование; торговое наименование; лекарственная форма; первичная упаковка; вторичная упаковка; условия хранения; сроки годности

Для цитирования: Косенко В.В., Ягудина Р.И., Леднев О.А., Серпик В.Г. Анализ ассортимента лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(1):79–89. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-79-89>

V.V. Kosenko ,
R.I. Yagudina ,
O.A. Lednev,
V.G. Serpik 

Analysis of the Medicinal Products for Human Use Authorised in the Russian Federation

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

✉ **Roza I. Yagudina;** yagudina@expmed.ru

ABSTRACT

The available range of medicinal products is growing every year. **The aim of the study** was to analyse the range of medicines authorised in the Russian Federation. **Materials and methods:** the analysis covered the data presented in the State Register of Medicines (as of June 2021) and the current regulations specifying the range of medicines. **Results:** this article presents the results of analysis of medicines authorised in the Russian Federation, in terms of the following parameters: international non-proprietary names, trade names, groups according to the Anatomical Therapeutic Chemical Classification System, dosage forms, routes of administration, primary and secondary packaging, storage conditions, and shelf life. The analysis demonstrated that there are over 19 thousand medicines authorised in the Russian Federation, most of which are produced in Russia. The largest groups of medicines are antimicrobial products for systemic use, medicines for the treatment of nervous system and cardiovascular system disorders. The most common dosage form is tablets, and the most common primary packaging is vials. The most frequent storage temperature requirements are 15–25 and 2–8 °C. About half of all medicines have the shelf life of 3 years. **Conclusions:** the data presented in this article can be used for unification of approaches to maintaining the State Register of Medicines, elaboration of reference books, and will be useful for medicine developers and manufacturers when planning and preparing regulatory submissions.

Key words: range of medicines; State Register of Medicines; international non-proprietary name; trade name; dosage form; primary packaging; secondary packaging; storage conditions; shelf life

For citation: Kosenko V.V., Yagudina R.I., Lednev O.A., Serpik V.G. Analysis of the medicinal products for human use authorised in the Russian Federation. *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):79–89. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-79-89>

Введение

Ассортимент лекарственных средств (ЛС), разрешенных к медицинскому применению, с каждым годом расширяется. Разрабатываются и регистрируются новые лекарственные препараты (ЛП), совершенствуются лекарственные формы, уточняются отдельные характеристики ЛП.

Как показал ретроспективный анализ научных публикаций, исследования ассортимента зарегистрированных ЛС проводились в разрезе фармакологических групп, происхождения ЛП (например, растительного), способа их применения [1–3]. Статьи ряда авторов посвящены изучению лекарственных форм и сроков годности [4, 5]. В то же время исследований современного ассортимента зарегистрированных в Российской Федерации ЛС по основным параметрам в последние годы не проводилось,

что предопределило актуальность данной работы.

В соответствии с положениями Федерального закона Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» все ЛП, разрешенные к медицинскому применению, включаются в государственный реестр ЛС. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 09.02.2016 № 80н «Об утверждении порядка ведения государственного реестра лекарственных средств для медицинского применения» определен порядок его ведения.

Цель работы – анализ ассортимента ЛС, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации (по состоянию государственного реестра лекарственных средств на июнь 2021 г.).

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели были проанализированы данные государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) по состоянию на июнь 2021 г. по номенклатуре, анато-терапевтическо-химической (АТХ) классификации, лекарственным формам ЛС, путям введения, виду упаковок, условиям хранения и срокам годности ЛП, а также требования нормативных правовых актов, регламентирующих обращение ЛС в Российской Федерации и Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС), данные Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и научные публикации по выбранной тематике с использованием методов группировки, контент-анализа, а также ретроспективного, логического, графического и структурного методов анализа.

Результаты и их обсуждение

Анализ ассортимента лекарственных препаратов по наименованиям. Структура государственного реестра отражает регистрацию как в разрезе международных непатентованных наименований (МНН), химических наименований (ХН), группировочных наименований (ГП), так и торговых наименований (ТН). МНН – это уникальное наименование ЛС, которое присваивается ВОЗ, признаваемое во всем мире и являющееся общественной собственностью¹. По состоянию на 2017 г. перечень (список) ВОЗ включал 9300 МНН, и каждый год этот список пополняется ~160 новыми МНН².

Под группировочным наименованием понимается наименование ЛП, не имеющего международного непатентованного наименования, или комбинации лекарственных препаратов, используемой в целях объединения их в группу под одним наименованием исходя из одинакового состава действующих веществ³. Химическое наименование лекарственного препарата выбирается в соответствии с номенклатурой Международного союза по теоретической и прикладной химии (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)⁴. Торговое наименование лекарственного препарата – наименование,

под которым зарегистрирован лекарственный препарат⁵.

Как показали результаты проведенного анализа, до 33% ЛП регистрируется под небрендированным названием (МНН или группировочное наименование). Ассортимент ЛС, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации, базируется на 1285 МНН, 862 группировочных и 38 химических наименованиях (рис. 1).

Как показали результаты анализа ГРЛС в динамике, интенсивность регистрации ЛС в различные годы была разной (рис. 2). Наиболее активно регистрационные процессы протекали с 2008 по 2011 г., минимальное количество ЛС регистрировалось в 2013–2014 гг. В 2018–2021 гг. в государственный реестр ежегодно вносились данные немногим более 1000 регистрационных удостоверений (РУ). За последние 10 лет (с 2011 по июнь 2021 г.) было зарегистрировано 128 МНН, максимальное количество из которых (49) было зарегистрировано в 2012 г. (рис. 3). ЛС с группировочными наименованиями наиболее активно, как следует из приведенных



Рис. 1. Структура ассортимента по видам наименований лекарственных препаратов, включенных в государственный реестр лекарственных средств, по состоянию на июнь 2021 г., %

Fig. 1. Proportion (%) of different medicine names in the State Register of Medicines, as of June 2021

¹ www.who.int

² Guidance on the use of international nonproprietary names (INNS) for pharmaceutical substances. World Health Organization; 2017.

³ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 23.04.2019 № 13 «О Правилах составления группировочных наименований лекарственных препаратов».

⁴ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29.06.2016 № 429н «Об утверждении Правил рационального выбора наименований лекарственных препаратов для медицинского применения».

⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

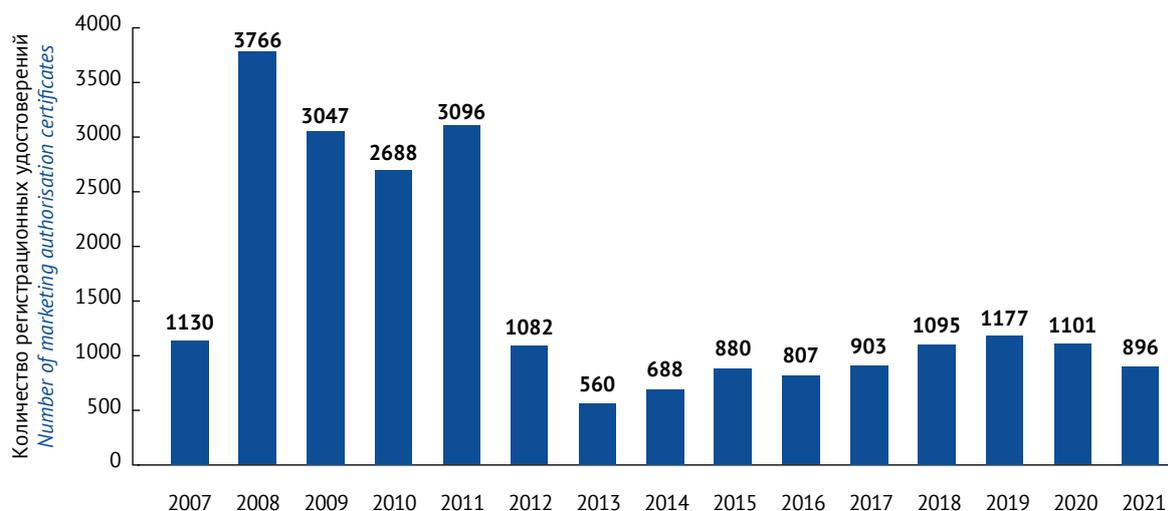


Рис. 2. Количество регистрационных удостоверений, выданных в период 2007–2021 гг.

Fig. 2. Marketing authorisation certificates issued from 2007 until 2021

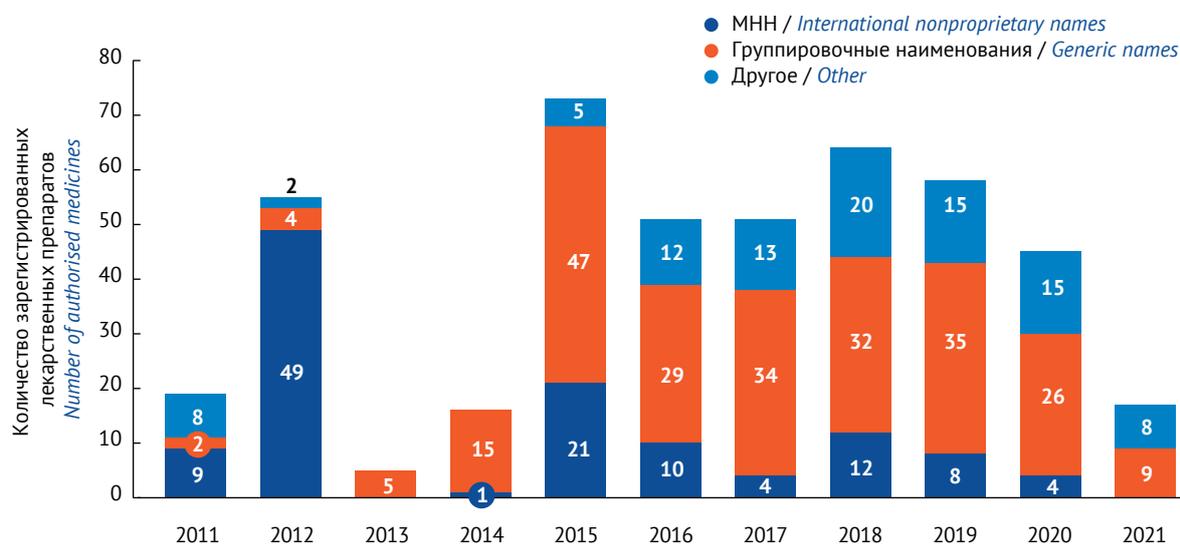


Рис. 3. Количество зарегистрированных лекарственных препаратов в период 2011–2021 гг. по видам наименований

Fig. 3. Medicinal products authorised from 2011 until 2021 (by medicine names)

на рисунке 3 данных, регистрировали в 2015 г. (47), а с химическими – в 2018 г. (20).

Ассортимент ЛП насчитывает более 19 тыс. позиций по торговым наименованиям, из которых около 13 тыс. уникальные (не повторяющиеся).

Периодически в фармацевтической отрасли возникает обсуждение целесообразности регистрации большого количества воспроизведенных ЛП с одним и тем же МНН, у которых много РУ (регистрируются многими компаниями). Проведенный нами анализ показал, что в отношении ряда МНН сформировалась очень высокая синонимия. Больше всего

воспроизведенных ЛП зарегистрировано для МНН этанол (табл. 1).

В ходе анализа данных о ЛП, произведенных в различных государствах, установлено, что в ГРЛС внесены данные о ЛП из 68 стран, среди которых преобладают ЛС, РУ на которые выданы производителям из Индии, Германии, Швейцарии, Словении, Республики Беларусь, Франции, Венгрии, Израиля и США.

С 2009 г. в Российской Федерации активизировались процессы локализации производства ЛП. В стимулировании процессов локализации значительная роль принадлежит

Таблица 1. Количество регистрационных удостоверений, выданных для препаратов с некоторыми МНН**Table 1.** Marketing authorisation certificates issued for some INNs

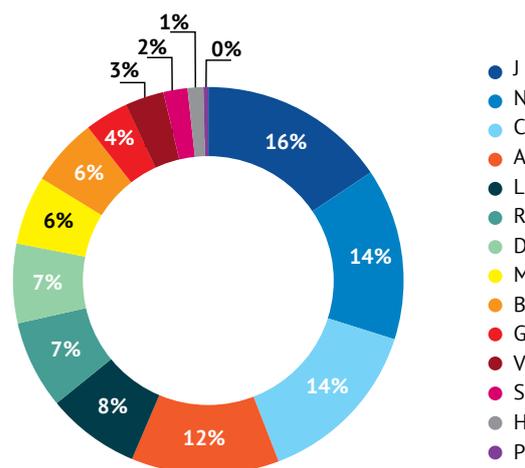
Международное непатентованное название <i>International nonproprietary name</i>	Количество выданных регистрационных удостоверений <i>Number of marketing authorisations issued</i>	Количество уникальных производителей <i>Number of manufacturers</i>
Этанол <i>Ethanol</i>	185	66
Метформин <i>Metformin</i>	142	41
Розувастатин <i>Rosuvastatin</i>	137	33
Диклофенак <i>Diclofenac</i>	137	81
Кислород <i>Oxygen</i>	117	117

приказу Министерства экономического развития Российской Федерации от 05.12.2008 № 427 «Об условиях допуска товаров, происходящих из иностранных государств, для целей размещения заказов на поставки товаров для государственных или муниципальных нужд», которым была установлена 15% преференция для ЛП отечественного происхождения при закупках для государственных и муниципальных нужд. Производство ЛП до стадии выпускающего контроля качества локализовано для 35% зарегистрированных препаратов, до стадии упаковки/фасовки в первичную упаковку – 32%, до стадии упаковки/фасовки во вторичную/третичную упаковку – 35%.

Анализ ассортимента лекарственных препаратов по анатомо-терапевтической-химической классификации. В ГРЛС также отражена принадлежность ЛС к определенной группе по АТХ-классификации в соответствии с их химическими, фармакологическими и терапевтическими свойствами⁶. Как следует из данных, представленных на рисунке 4, наибольшее количество ЛП относится к группе с кодом J «Противомикробные препараты для системного использования» (16% от общего числа, более 3270 позиций). На втором месте находятся две группы: с кодом N «Препараты для лечения заболеваний нервной системы» (14%, 3010 позиций) и кодом С «Препараты для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы» (14%, 2991 позиция). Меньше всего ЛС (по РУ) относится к группам с кодом Н «Гормональные препараты для системного использования (исключая половые гормоны)» (271 позиция), кодом Р «Противопаразитарные препараты,

инсектициды и репелленты» (84 позиции), кодом S «Препараты для лечения заболеваний органов чувств» (424 позиции).

Анализ ассортимента лекарственных препаратов по лекарственным формам и путям введения. Важное значение для реализации клинического эффекта ЛП имеет его лекарственная форма. Проведенный нами анализ показал, что всего в ГРЛС представлены более 50 уникальных (неповторяющихся) базовых лекарственных форм: аэрозоль, бальзам, газ, гель, гранулы, драже, капли, капсулы, клей, крем, линимент, мазь, настойка, спрей, паста, порошок, сироп, суппозитории, суспензия, таблетки, экстракт и др.

**Рис. 4.** Распределение регистрационных удостоверений по группам АТХ-классификации (буквами обозначены коды групп)**Fig. 4.** Distribution of marketing authorisation certificates by ATC classification groups

⁶ Introduction to drug utilization research. WHO; 2003.

В государственный реестр также включено более 40 видов лекарственного растительного сырья: кора измельченная, кора порошок, корневища и корни измельченные, корневища и корни порошок, корневища с корнями измельченные, корневища с корнями порошок, корни измельченные, корни порошок, листья измельченные, листья порошок, листья цельные, листья-порошок, листья-порошок и гранулы резано-прессованные, плоды измельченные, плоды порошок, плоды цельные, побеги измельченные, почки цельные, сбор измельченный, сбор порошок, сбор-порошок, семена цельные, слоевища измельченные, соплодия измельченные, соплодия порошок, столбики с рыльцами измельченные, сырье растительное, сырье растительное измельченное, сырье растительное – порошок, цветки измельченные, цветки обмолоченные измельченные, цветки порошок, цветки цельные, цветки-порошок, цветки-порошок и гранулы резано-прессованные, трава измельченная, трава порошок, трава резано-прессованная, трава-порошок, трава-порошок и гранулы резано-прессованные, чага измельченная.

В ходе изучения представленности лекарственных форм в государственном реестре по количеству РУ установлено, что 95% всех РУ выдано на такие лекарственные формы, как таблетки, растворы, капсулы, порошки, лиофилизат, лекарственное растительное сырье, капли, мазь, гранулы, настойка, суппозиторий, спрей, суспензия, гель, сироп, газ и аэрозоль (рис. 5); самой распространенной лекарственной формой являются таблетки – более 8900 РУ.

Лекарственные формы могут подразделяться на подвиды (подгруппы) в зависимости

от способа применения, фармацевтических характеристик или других свойств. Так, например, такая распространенная лекарственная форма, как таблетки, представлена в государственном реестре более чем 20 вариантами: таблетки вагинальные, таблетки гомеопатические, таблетки диспергируемые, таблетки для имплантации, таблетки для приготовления глазных капель, таблетки для рассасывания, таблетки жевательные, таблетки защечные, таблетки кишечнорастворимые, таблетки подъязычные, таблетки, покрытые оболочкой, таблетки, покрытые оболочкой, делимые, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, делимые, таблетки пролонгированного действия, таблетки растворимые, таблетки ретард, таблетки с контролируемым высвобождением, таблетки модифицированного высвобождения, таблетки с пролонгированным высвобождением, таблетки сублингвальные, таблетки шипучие, таблетка-лиофилизат.

Детальный анализ количественного распределения РУ по видам таблеток показал, что преобладающее большинство ЛП в этой лекарственной форме зарегистрировано как таблетки без уточнения вида (37,63%) и таблетки, покрытые оболочкой (50,63%). Таблеток для рассасывания, таблеток жевательных, таблеток подъязычных, таблеток шипучих, таблеток диспергируемых, таблеток вагинальных и др. зарегистрировано менее 1% для каждого вида.

Разнообразие различных вариаций характерно и для других лекарственных форм. Так, например, растворов представлено 35 вариантов и 115 уникальных комбинаций. На другие лекарственные формы приходится около 5% всех РУ

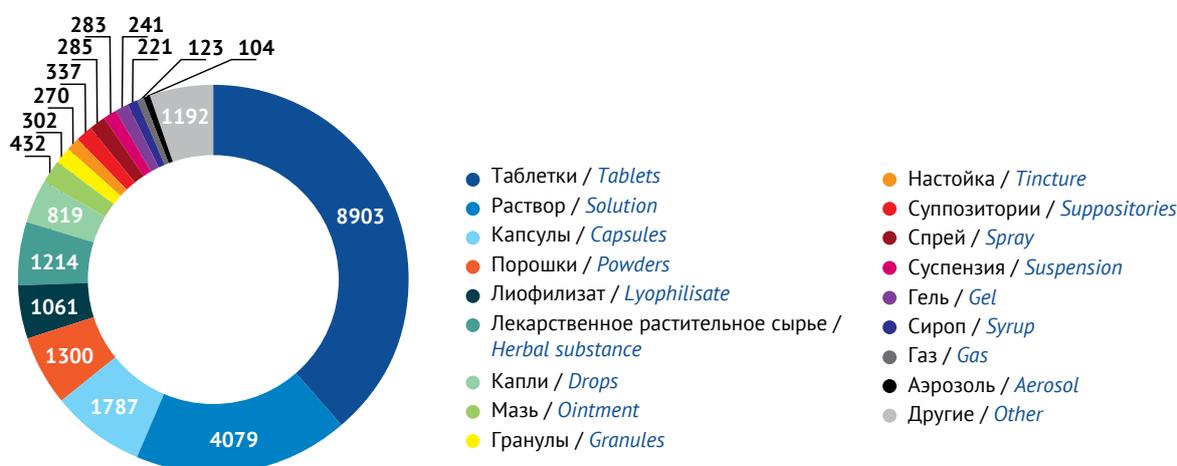


Рис. 5. Распределение лекарственных форм по количеству регистрационных удостоверений

Fig. 5. Dosage forms relative to the number of marketing authorisations

(рис. 5). К таким лекарственным формам относятся: эмульсия, линимент, паста, пластырь, оподельдок, пленки, имплантат, плитки, сок, экстракт, драже, пастилки, микросферы, шампунь, лак, пена, бальзам, пеллеты, клей, пилюли, масло, эликсир, жидкость, губка и др.

Каждая лекарственная форма предполагает определенный способ ее введения в организм человека. Проведенный анализ показал, что в государственном реестре указано около 90 путей введения ЛП (табл. 2).

Всего в ГРЛС насчитывается более 680 комбинаций лекарственных форм и путей введения.

Анализ ассортимента лекарственных препаратов по видам упаковки. Одной из характеристик ЛП является упаковка. Выделяют первичную и вторичную упаковки, а также комплектующие устройства. Первичная упаковка выполняет функции обеспечения сохранности фармакологических и физико-химических свойств, удобства дозиро-

вания, применения и др. В ГРЛС представлено 57 базовых видов первичной упаковки (табл. 3). В количественном отношении преобладают такие виды упаковки, как флаконы (более 4400), упаковки (более 3700), блистеры (более 2000), банки (более 2000) и ампулы (более 1600) (рис. 6).

Отдельные виды упаковок представлены большим количеством вариаций. Так, например, ассортимент флаконов насчитывает 66 вариантов комбинаций материала изготовления, комплектующих устройств и других технологических особенностей.

Всего в ГРЛС приведено около 380 различных вариантов комбинаций первичной упаковки и видов материала, комплектующих устройств и других технологических особенностей.

Разнообразие вторичной упаковки ЛС охватывает 46 ее видов (рис. 7). Наиболее массовыми видами вторичной упаковки являются пачки (78%), коробки (11%) и ящики (3%).

Таблица 2. Виды путей введения лекарственных средств в соответствии с государственным реестром лекарственных средств

Table 2. Routes of administration according to the State Register of Medicines

Путь введения лекарственного препарата <i>Administration route</i>		
Энтеральный <i>Enteral</i>	Ректальный <i>Rectal</i>	Интрабурсальный <i>Intrabursal</i>
Для приема внутрь <i>Oral</i>	Парентеральный <i>Parenteral</i>	Внутрихрящевой <i>Intracartilaginous</i>
Гастральный <i>Gastral</i>	Внутриартериальный <i>Intra-arterial</i>	Интрастеральный <i>Intrasternal</i>
Гастроэнтеральный <i>Gastroenteral</i>	Интракоронарный <i>Intracoronary</i>	Внутрикостный <i>Intraosseous</i>
Интестинальный <i>Intestinal</i>	Внутривенный <i>Intravenous</i>	Периостальный <i>Periosteal</i>
Наружный <i>External</i>	Интрапортальный <i>Intraportal</i>	Интракардиальный <i>Intracardiac</i>
Кожный <i>Cutaneous</i>	Внутрилимфатический <i>Intralymphatic</i>	Интрацервикальный <i>Intracervical</i>
Трансдермальный <i>Transdermal</i>	Внутримышечный <i>Intramuscular</i>	Внутрипузырный <i>Intravesicular</i>
Внутриэпидермальный <i>Intra-epidermal</i>	Внутрикожный <i>Intradermal</i>	Интраперикардиальный <i>Intrapericardial</i>
Кожная скарификация <i>Skin scarification</i>	Подкожный <i>Subcutaneous</i>	Внутриплевральный <i>Intrapleural</i>
На очаг повреждения <i>Onto the lesion site</i>	Субмукозный <i>Submucosal</i>	Интраперитонеальный <i>Intraperitoneal</i>
Местный <i>Topical</i>	Интрахолагиопанкреатический <i>Intracholangiopancreatic</i>	Интрагландулярный <i>Intraglandular</i>
Оромукозный <i>Oromucosal</i>	Внутрисинусный <i>Intrasinal</i>	Интрапростатический <i>Intraprostatic</i>

Продолжение таблицы 2

Table 2 (continued)

Путь введения лекарственного препарата <i>Administration route</i>		
Подъязычный <i>Sublingual</i>	Интраокулярный <i>Intra-ocular</i>	Интракавернозный <i>Intracavernous</i>
Буккальный <i>Buccal</i>	Субконъюнктивальный <i>Subconjunctival</i>	Интраамниотический <i>Intra-amniotic</i>
Гингивальный <i>Gingival</i>	Ретробульбарный <i>Retrobulbar</i>	Экстраамниотический <i>Extra-amniotic</i>
Дентальный <i>Dental</i>	В переднюю камеру глаза <i>Into the anterior chamber of the eye</i>	Внутриочага повреждения <i>Intralesional</i>
Периодонтальный <i>Periodontal</i>	Интравитреальный <i>Intravitreal</i>	Внутриопухолевый <i>Intratumoral</i>
Назальный <i>Nasal</i>	Задний юкстасклеральный <i>Posterior juxtasccleral</i>	Околоопухолевый <i>Peritumoral</i>
Орофарингеальный <i>Oropharyngeal</i>	Субретинальный <i>Subretinal</i>	Экстракорпоральный <i>Extracorporeal</i>
Ларингофарингеальный <i>Laryngopharyngeal</i>	Периневральный <i>Perineural</i>	Имплантация <i>Implant</i>
Ингаляционный <i>Inhalational</i>	Интрацеребральный <i>Intracerebral</i>	Инфильтрация <i>Infiltration</i>
Эндотрахеопульмональный <i>Endotracheal</i>	Инtrateкальный <i>Intratecal</i>	Гемодиализ <i>Hemodialysis</i>
Ушной <i>Auricular (otic)</i>	Эпидуральный <i>Epidural</i>	Ионофорез <i>Ionophoresis</i>
Окулярный <i>Ophthalmic</i>	Интрацеребровентрикулярный <i>Intracerebroventricular</i>	Интракорнеальный <i>Intracorneal</i>
Уретральный <i>Urethral</i>	Интрацистеральный <i>Intracisternal</i>	Интраменингеальный <i>Intramenigeal</i>
Вагинальный <i>Vaginal</i>	Интрадискальный <i>Intradiscal (intraspinal)</i>	Интрапутаминовый <i>Intraputaminal</i>
Эндоцервикальный <i>Endocervical</i>	Внутрисуставный <i>Intra-articular</i>	Трансплцентарный <i>Transplacental</i>
Внутриматочный <i>Intra-uterine</i>	Периартикулярный <i>Periarticular</i>	Трансмаммарный <i>Transmammary</i>

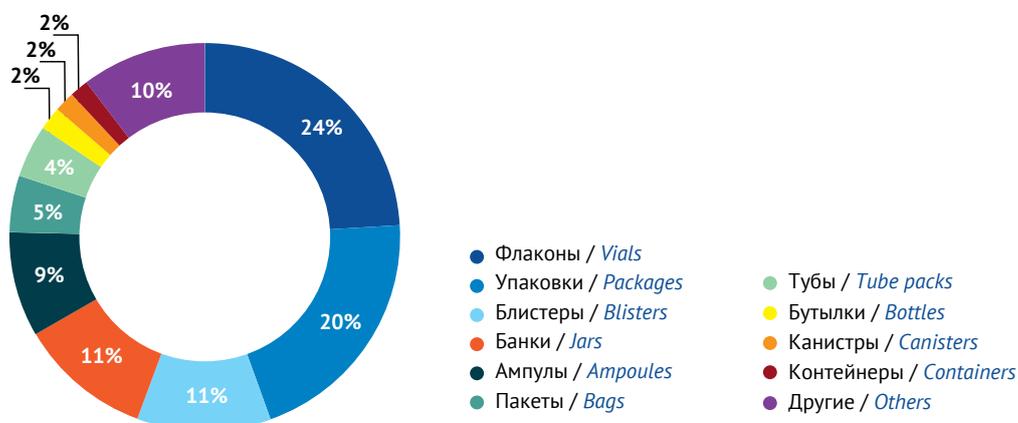


Рис. 6. Виды первичной упаковки лекарственных средств, зарегистрированных в государственном реестре лекарственных средств

Fig. 6. Types of primary packaging in the State Register of Medicines

Таблица 3. Виды первичных упаковок, представленных в государственном реестре лекарственных средств**Table 3.** Types of primary packaging according to the State Register of Medicines

Виды первичных упаковок <i>Types of primary packaging</i>		
Автоинжекторы <i>Autoinjectors</i>	Конверты <i>Pouches</i>	Резервуар-крышки <i>Reservoir lids</i>
Ампулы <i>Ampoules</i>	Контейнеры <i>Containers</i>	Ротадиски <i>Rotadisks</i>
Апликаторы <i>Applicators</i>	Короба <i>Cartons</i>	Саше <i>Sachets</i>
Баллончики <i>Small cylinders</i>	Коробки <i>Boxes</i>	Системы <i>Packaging systems</i>
Баллоны <i>Cylinders</i>	Матрицы <i>Matrices</i>	Стик-пакеты <i>Stick packs</i>
Банки <i>Jars</i>	Мешки <i>Sacks</i>	Стики <i>Sticks</i>
Барабаны <i>Drums</i>	Микроклизмы <i>Micro-enemas</i>	Стрипы <i>Strips</i>
Бидоны <i>Cans</i>	Микропробирки <i>Microtubes</i>	Тара <i>Packaging</i>
Блистеры <i>Blister packs</i>	Мини-пакеты <i>Mini-bags</i>	Тубы <i>Tube packs</i>
Блоки <i>Blocks</i>	Моноблоки <i>Monoblocks</i>	Тюбик-капельницы <i>Dropper tubes</i>
Бочки <i>Barrels</i>	Обертки <i>Wrappings</i>	Тюбики <i>Collapsible tubes</i>
Бумага <i>Paper</i>	Пакетики <i>Small bags</i>	Тюки <i>Parcels</i>
Бутылки <i>Bottles</i>	Пакеты <i>Bags</i>	Упаковки <i>Packages</i>
Ведро <i>Buckets</i>	Пачки <i>Packs</i>	Фильтр-пакеты <i>Filter bags</i>
Емкости <i>Vessels</i>	Пеналы <i>Cases</i>	Флаконы <i>Vials</i>
Ингаляторы <i>Inhalers</i>	Пленки <i>Films</i>	Фляги <i>Flasks</i>
Канистры <i>Canisters</i>	Пленочный материал <i>Film material</i>	Шприцы <i>Syringes</i>
Картриджи <i>Cartridges</i>	Подушечка <i>Pads</i>	Ячейки <i>Cells</i>
Компопласты <i>Compoplast containers</i>	Пробирки <i>Tubes</i>	Ящики <i>Packing boxes</i>

Анализ ассортимента лекарственных препаратов по условиям хранения и срокам годности.

В ГРЛС представлены указания о более чем 930 вариантах условий хранения, включающих комбинации температуры, влажности, света, электромагнитного излучения и др. Наиболее часто встречаются следующие указания: хранить в защищенном от света, от влаги месте, в сухом месте и при определенной температуре. Выделено более 100 температурных режимов

хранения, которые могут обозначаться в виде числовых интервалов, полуинтервальных режимов (с нормированием только верхней или только нижней границы температуры) или формулироваться с помощью принятых в фармакопейной практике терминов.

Всего в ГРЛС встречается более 80 интервалов температурных режимов хранения ЛП. При анализе встречаемости этих интервалов (рис. 8)

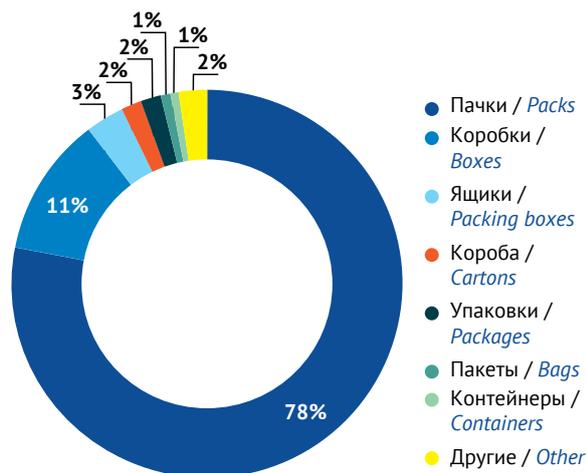


Рис. 7. Виды вторичной упаковки лекарственных средств, зарегистрированных в государственном реестре лекарственных средств

Fig. 7. Types of secondary packaging in the State Register of Medicines

выявлено, что чаще всего ЛП требуется хранить при температуре 15–25 и 2–8 °С.

Полуинтервальные режимы хранения представлены в 20 вариантах с диапазоном температур от 40 до –55 °С. При этом преобладают режимы с указанием «не выше».

Также встречается маркирование температурного режима путем указания принятых терминологических оборотов: «хранить при комнатной температуре», «хранить в холодильнике», «в холодильнике / не рядом с морозильной камерой»; «допускается замораживание при транспортировке» и др.

Требования к влажности могут быть приведены как в интервальном виде (2 варианта), так и с указанием только верхней границы нормы (не выше).

Для отдельных ЛС даны формулировки особых режимов хранения, согласно которым ЛС рекомендуется хранить в месте, «защищенном от влаги», «от света», «от влаги и света», «от света и влаги», «от сильных электромагнитных полей», «от света и рентгеновского излучения» и др.

Сроки хранения ЛП, внесенных в ГРЛС, представлены 35 вариантами: от 1 дня до 7 лет. Наиболее часто встречаются следующие сроки годности: 3 года (46%), 2 года (33%) и 5 лет (12%).

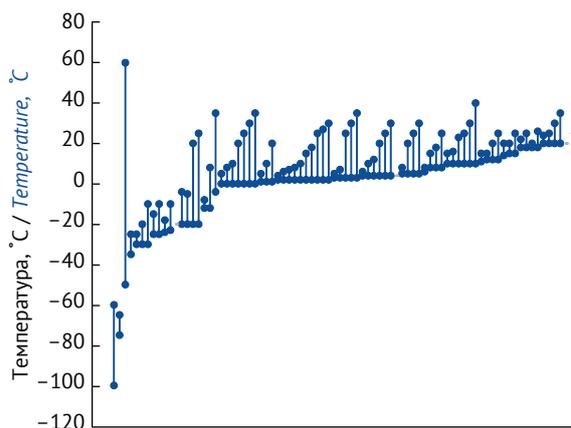


Рис. 8. Варианты температурных режимов хранения лекарственных препаратов, выраженные в числовых интервалах температуры

Fig. 8. Storage temperature requirements expressed as temperature ranges

Заключение

Таким образом, проведенный нами анализ ГРЛС показал, что ассортимент лекарственных средств, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации, насчитывает более 19000 позиций, производство большинства из которых локализовано в Российской Федерации. Преобладают ЛП, относящиеся к противомикробным препаратам для системного использования; препаратам для лечения заболеваний нервной и сердечно-сосудистой систем. Наиболее распространенными лекарственными формами являются таблетки, первичной упаковкой – флаконы. Среди режимов хранения преобладают температурные интервалы 15–5 и 2–8 °С. Около половины всех включенных в государственный реестр ЛС имеют срок годности 3 года.

Авторы полагают, что представленная в статье информация может быть учтена при унификации подходов к ведению государственного реестра лекарственных средств, в том числе в процессе создания соответствующих справочников, использована разработчиками и производителями ЛС при подготовке к экспертизе и регистрации лекарственных препаратов и формировании регистрационных досье, а также может послужить основой для проведения углубленного анализа какого-либо из параметров ЛС, включенных в государственный реестр.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Петухова ЕП, Белоусов ЕА, Киселева ВА, Карасев ММ, Белоусова ОВ. Исследование ассортимента лекарственных средств по фармакологическим группам. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2020;4:241–2. [Petukhova EP, Belousov EA, Kiseleva VA, Karasev MM, Belousova OV. Study of the range of drugs by pharmacological groups. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya = Izvestiya GSTU. Medicine, pharmacy*. 2020;4:241–2 (In Russ.)]
2. Дремова НБ, Афанасьева ТГ. Основные тенденции развития ассортимента лекарственных растительных препаратов. В кн.: *Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики*. Владикавказ; 2014. С. 154–7. [Dremova NB, Afanasyeva TG. The major trends of development of medical herbal medicines assortment. In: *Actual problems of pharmaceutical science and practice*. Vladikavkaz; 2014. P. 154–7 (In Russ.)]
3. Хаджиева ЗД, Алейникова НС. Анализ номенклатуры готовых лекарственных средств для наружного применения. *Успехи современной науки и образования*. 2017;9(4):156–60. [Khadzhieva ZD, Aleynikova NS. Analysis of nomenclature of ready medicines for external application. *Uspekhii sovremennoy nauki i obrazovaniya = Success of Modern Science and Education*. 2017;9(4):156–60 (In Russ.)]
4. Саенко АЮ, Попова ЕА, Куль ИЯ, Петров АЮ. Маркетинговое исследование суппозиторий, включенных в государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. *Ремедиум*. 2018;(3):29–32. [Saenko AYU, Popova EA, Kul IYA, Petrov AYU. Marketing study of suppositories included in the State Register of medicinal products of the Russian Federation. *Remedium = Remedium*. 2018;(3):29–32 (In Russ.)]
5. Кричовська АМ, Пузанова ІП, Громовик БП, Стасевич МВ, Журахівська ЛР, Хоменко ІМ, Новіков ВП. Ретроспективний моніторинг змін термінів придатності основних лікарських засобів. Український біофармацевтичний журнал. 2012;1–2:18–21. [Krychkovska AM, Puzanova IP, Gromovyk BP, Stasevych MV, Zhurakhivska LR, Khomenko IM, Novikov VP. Retrospective monitoring of changes of expiration dates of basic drugs. *Ukrains'kiy biofarmatsevtichny zhurnal = Ukrainian Biopharmaceutical Journal*. 2012;1–2:18–21 (In Ukrainian)]

Вклад авторов. В.В. Косенко — концепция и дизайн работы, критический пересмотр статьи; Р.И. Ягудина — анализ данных, написание текста статьи; О.А. Леднев — сбор и обработка данных; В.Г. Серпик — анализ данных, иллюстративное оформление рукописи.

Благодарности. Выражаем признательность сотрудникам Управления информатизации ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России за помощь в предоставлении данных.

Конфликт интересов. В. В. Косенко является главным редактором, Р. И. Ягудина — членом редколлегии журнала «Ведомости 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. Valentina V. Kosenko—elaboration of the concept and design of the study, revision of the article; Roza I. Yagudina—data analysis, writing of the text; Oleg A. Lednev—collection and processing of data; Vyacheslav G. Serpik—data analysis, preparation of graphs and diagrams.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the employees of the FSBI “SCEEMP” Information Technology Division for provision of the data.

Conflict of interest. Valentina V. Kosenko is Editor-in-Chief of *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulatorynye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv*, Roza I. Yagudina is a member of the Editorial Board of *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulatorynye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Косенко Валентина Владимировна, канд. фарм. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
general@expmed.ru

Ягудина Роза Исмаиловна, д-р фарм. наук, профессор. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9080-332X>
yagudina@expmed.ru

Леднев Олег Андреевич. SPIN-код РИНЦ: 9918-4729
Lednev@expmed.ru

Серпик Вячеслав Геннадьевич, канд. фарм. наук, доцент. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6896-2842>
Serpik@expmed.ru

Valentina V. Kosenko, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8353-7863>
general@expmed.ru

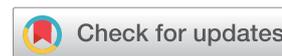
Roza I. Yagudina, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9080-332X>
yagudina@expmed.ru

Oleg A. Lednev. SPIN-код РИНЦ: 9918-4729
Lednev@expmed.ru

Vyacheslav G. Serpik, Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6896-2842>
Serpik@expmed.ru

Статья поступила 30.01.2022
После доработки 28.02.2022
Принята к печати 04.03.2022

Article was received 30 January 2022
Revised 28 February 2022
Accepted for publication 4 March 2022



А.Д. Дурнев 
А.К. Жанатаев 

Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии
имени В. В. Закусова»,
Балтийская ул., д. 8, Москва, 125315, Российская Федерация

✉ Дурнев Андрей Дмитриевич; addurnev@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Генотоксические поражения рассматриваются не только как причина наследственной и онкологической патологий, но и как наиболее общий фактор, играющий существенную роль в этиопатологии сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, репродуктивных потерь, бесплодия и старения. Это определяет необходимость тщательного контроля за распространением потенциальных генотоксикантов, в том числе среди лекарственных средств (ЛС), как группы соединений, направленно и регулярно используемых человеком. Оценка генотоксичности является неотъемлемым элементом в системе доклинических исследований безопасности ЛС. Цель работы – анализ современного состояния и возможных путей решения методологических и регуляторных проблем в области генотоксикологии для надлежащего проведения доклинических исследований безопасности лекарственных средств. В работе обобщены сведения о фундаментальных представлениях, составивших базу для развития современной генетической токсикологии, рассмотрена история развития исследований, направленных на выявление мутагенных, кластогенных и анеугенных эффектов. Проанализированы регуляторные аспекты генотоксикологических исследований ЛС, рассмотрены вопросы совершенствования стратегии проведения тестирования на генотоксичность. Представлены сведения о тестах на генотоксичность, регламентированных для ЛС, рекомендации по выбору взаимозаменяемых тестов в зависимости от особенностей конкретного исследования. Проведен сравнительный анализ преимуществ и недостатков тестов. Подчеркнуто, что исследование каждого ЛС является самостоятельной научной задачей. Обсуждены вопросы интерпретации и трактовки результатов, предиктивность генотоксикологических исследований для прогноза потенциальной канцерогенности. Даны предложения по совершенствованию стратегии оценки генотоксичности ЛС, в частности рассмотрены возможности ее частичного совмещения с исследованиями по общей токсичности. Подчеркнута необходимость разработки методов регистрации генотоксических событий в генеративных клетках, оценены перспективы внедрения новых тестов, рассмотрены направления фундаментальных и поисковых исследований в области лекарственной генотоксикологии.

Ключевые слова: лекарственные средства; генотоксичность; канцерогенность; мутагенность; доклинические исследования

Для цитирования: Дурнев А.Д., Жанатаев А.К. Актуальные аспекты генетической токсикологии лекарственных средств. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(1):90–109. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-90-109>

A.D. Durnev  ,
A.K. Zhanataev 

Relevant Aspects of Drug Genetic Toxicology

Zakusov Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation

✉ **Andrey D. Durnev**; addurnev@mail.ru

ABSTRACT

Genotoxic lesions are not only a cause of genetic pathologies and cancer, but also the most common and significant factor of the etiopathology of cardiovascular and neurodegenerative disorders, reproductive losses, infertility, and aging. This requires careful monitoring of the use of potential genotoxicants including medicinal products (MPs), which are a group of compounds intentionally and routinely used by humans. Genotoxicity assessment is highly essential in preclinical drug safety studies. The aim of the study was to analyse the current situation and reveal possible ways of addressing methodological and regulatory issues in genotoxicology to enable proper conduction of drug safety preclinical studies. The article summarises basic concepts of the modern genetic toxicology development and highlights the history of research aimed at identifying mutagenic, clastogenic, and aneugenic effects. The authors analyse regulatory aspects of genotoxicological studies of MPs and consider issues of improving the strategy for genotoxicity testing. The paper gives information about the genotoxicity tests approved for MPs, recommendations for interchangeability of tests in relation to particular study characteristics. The authors carried out a comparative analysis of the tests' pros and cons with an emphasis that the study of each MP is a separate scientific task. They discuss interpretation of results and prediction of MP carcinogenic potential in genotoxicological studies. Recommendations are given for the optimisation of the MP genotoxicity assessment strategy, considering its partial integration into general toxicity studies. The article stresses the urgent need to develop registration methods for genotoxic events in germ cells, assesses the prospects of new tests, and reviews new trends in drug genotoxicology fundamental research.

Key words: medicinal products; genotoxicity; carcinogenicity; mutagenicity; preclinical studies

For citation: Durnev A.D., Zhanataev A.K. Relevant aspects of drug genetic toxicology. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Reguljatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2022;12(1):90–109. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-90-109>

Введение

Оценка генотоксических свойств является обязательным этапом доклинического исследования лекарственных средств (ЛС). Эта позиция разделяется всеми национальными регуляторными органами и поддержана международными организациями, деятельность которых направлена на совершенствование и гармонизацию доклинических исследований: Организацией экономического сотрудничества и развития (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD), Международным советом по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH), Всемирной организацией здравоохранения, Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарствен-

ных средств (Food and Drug Administration, FDA) и др. Новые фундаментальные представления о механизмах и закономерностях генотоксических событий, выявление недостатков принятой методологии на основе опыта ее практического применения, развитие технологий, позволяющих расширить возможности существующих методик и разработать принципиально новые, составляют в совокупности базу для периодического пересмотра стратегии и методологии тестирования ЛС на генотоксическую активность.

Цель работы — анализ современного состояния и возможных путей решения методологических и регуляторных проблем в области генотоксикологии для надлежащего проведения доклинических исследований безопасности лекарственных средств.

История и основные понятия

Открытие радиационного (Г. Меллер, 1927), а затем химического мутагенеза (В. В. Сахаров, 1933; И. А. Рапопорт, 1946; Ш. Ауэрбах, 1947) произошло в первой половине двадцатого столетия. Эти фундаментальные наблюдения раскрыли источник возникновения генетического груза, концепция которого была предложена Дж. Холдейном (1965) и под которым сегодня понимается сумма мутаций, снижающих приспособленность и выживание популяций, а в медицинском плане приводящих к многочисленным генетически обусловленным заболеваниям, угрожающим жизни и здоровью людей и их потомков [1–3].

С открытием структуры ДНК был получен молекулярный базис, на основе которого были начаты исследования природы и молекулярных механизмов индукции генных, хромосомных и геномных мутаций, продолжающиеся в настоящее время. Был установлен ряд фактов фундаментальной значимости:

- мутагенез имеет общебиологический характер и присущ всем живым организмам от бактерий до высших организмов, включая человека;
- средняя частота спонтанного мутирования на locus или геном за поколение сходна у организмов близких таксономических групп (спонтанный мутагенез);
- интенсивность спонтанного мутагенеза может быть существенно увеличена под действием экзогенных мутагенных факторов или эндогенных мутагенных метаболитов (индуцированный мутагенез);
- мутагенез – многоэтапный процесс: первичные повреждения ДНК фиксируются в генные (мутагенез) и хромосомные (кластогенез) мутации в процессе репарации и репликации ДНК;
- возникновение геномных мутаций (анеугенез) связано с нарушениями расхождения хромосом в митозе и мейозе;
- вновь индуцируемые мутации поддерживают в популяции уровни наследственных и онкологических заболеваний, приводят к репродуктивным потерям;
- химические мутагены подразделены на прямые и непрямые, т.е. требующие метаболической активации, ДНК-реактивные и ДНК-нереактивные, а также классифицируются по непосредственному механизму действия (алкилирующие агенты, интеркаляторы,

прооксиданты и др.), по химической природе (полициклические углеводороды, пирролизинные алкалоиды, гетероциклические амины и др.), по источнику происхождения (лекарственные, пищевые, производственные и др.);

- индуцированный мутагенез может быть усилен под действием химических соединений – комутагенов или ослаблен под действием антимутагенов;
- увеличение спонтанных уровней первичных повреждений ДНК наблюдается при многих заболеваниях, коррелирует с нарушениями онтогенеза и может иметь самостоятельную патогенетическую значимость.

В середине прошлого столетия понимание опасности мутагенеза способствовало возникновению на стыке научных дисциплин генетической токсикологии – совокупности фундаментальных и прикладных исследований, конечной целью которых является выявление генотоксикантов и снижение/предотвращение их патогенных эффектов [4]. Ее основными задачами являются исследование механизмов и закономерностей мутагенеза в различных типах клеток, скрининг и мониторинг потенциальных генотоксикантов, разработка методов выявления генотоксических эффектов, изучение возможностей их модификации и оценка риска генотоксических воздействий в отношении здоровья.

На заре становления генотоксикологии ее главной прикладной задачей была оценка риска возникновения мутаций у человека под действием различных факторов окружающей среды, испытания их мутагенной и канцерогенной активностей являлись независимыми процедурами. С введением в практику генотоксикологических исследований экспресс-теста на бактериях – теста Эймса [5] – был накоплен массив экспериментальных данных по мутагенным эффектам известных канцерогенов. После выявления на основе сравнительного анализа этих данных сопряженности мутагенной активности в тесте Эймса с канцерогенностью *in vivo* стало очевидным, что результаты тестов на генотоксичность могут быть использованы и для прогнозирования канцерогенного риска. Это позволило рассматривать тесты на генотоксичность как краткосрочные тесты на канцерогенность, что отражено сегодня во многих методических документах, в том числе в отечественном издании «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств»¹.

¹ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

Таким образом, тестирование на генотоксическую активность преследует две цели: оценку собственно генотоксичности и оценку потенциальной канцерогенности.

Развитие генетической токсикологии способствовало разработке, апробации и внедрению большого количества методов и тест-систем для экспериментального выявления различных категорий индуцированных мутаций. Несмотря на прогрессивное развитие методической базы тестирования, ни тогда, ни сегодня нет теста, позволяющего одновременно, в рамках одного эксперимента определить способность соединения индуцировать различные категории мутаций в соматических и зародышевых клетках. Отсюда возник комплексный подход, предполагающий оценку индукции различных категорий мутаций в разных тестах, на разных тест-объектах. Предлагаемые к использованию тесты группировали в ступенчатые схемы, предполагавшие изменение направления исследований следующего этапа в зависимости от результатов предыдущего. Известными примерами реализации подобных подходов являются схема тестирования на мутагенность, разработанная коллективом авторов под руководством академика Н.П. Бочкова [6], и трехступенчатая схема Б.А. Бриджеса [7]. С их появлением была достигнута главная цель работ этого периода: создание системы скрининга химических мутагенов.

Центральные принципы современного генетического тестирования изложены в недавней работе [8], обобщающей опыт семинара «Стратегии в генотоксикологии: принятие инновационных научных методов в нормативном контексте: сильные и слабые стороны. От нормативной точки зрения до промышленной перспективы», состоявшегося на 47-м ежегодном собрании Европейского общества по экологическому мутагенезу и геномике (2019 г.). Они вытекают из предшествующих воззрений и констатируют, что глубина и объем тестирования должны определяться степенью воздействия вещества на человека, максимум информации должен добываться минимальными затратами труда и животных, а полное тестирование генотоксичности должно охватывать три конечные точки: мутации генов (мутагенность), структурные aberrации хромосом (кластогенность) и числовые хромосомные

мутации (анеуплоидия), что предусматривает комплексное использование разных тестов.

В существующей традиции под термином «генотоксичность» принято понимать всю совокупность предмутационных и мутационных событий (модификации структуры ДНК, генные, хромосомные и геномные мутации), а также обозначать этим термином способность вызывать первичные, предмутационные повреждения ДНК. Термины «мутагенность», «мутаген» вытесняются терминами «генотоксичность», «генотоксикант», «генотоксин».

Регуляторные аспекты генотоксикологии лекарственных средств

На ранних этапах развития учения об индуцированном мутагенезе стала ясна необходимость превентивного экспериментального тестирования вновь синтезируемых и уже применяющихся химических соединений на мутагенность, и было определено, что первоочередность такой работы должна исходить из масштабов распространения и длительности их контакта с человеком. Исходя из этих критериев была актуализирована задача тестирования ЛС на мутагенность, поскольку именно ЛС длительно, регулярно и адресно применяются человеком.

Из множества разработанных тестов на генотоксичность в целях регуляторной оценки ЛС используют методы, валидированные в масштабных межлабораторных исследованиях и многолетней практикой применения. Последний пересмотр пригодности генотоксических тестов, проведенный OECD, пришелся на 2014–2015 гг., его результаты представлены в таблице 1. Следует отметить, что из списка тестов были удалены тесты на *Saccharomyces cerevisiae* и на *Drosophila melanogaster*, тест на внеплановый синтез ДНК и тест по учету сестринских хроматидных обменов (СХО-тест). Однако сделана оговорка, что ранее полученные данные могут использоваться для оценки генотоксического риска². Эта оговорка позволяет не проявлять поспешность при отказе от применения дрозофилы в системе тестирования. Помимо того что в тесте на *D. melanogaster* возможно регистрировать рекомбиногенные события, он незаменим при проверке неопределенных результатов, получаемых в тесте Эймса или в тестах *in vitro*.

² OECD iLibrary: Current status of the test guidelines for genetic toxicology. <https://www.oecd-ilibrary.org>

Таблица 1. Список методических указаний Организации экономического сотрудничества и развития по проведению тестов на генотоксичность химических соединений³

Table 1. List of the guidelines of Organization for Economic Co-operation and Development for genetic toxicity testing of chemicals³

Номер рекомендаций <i>Test Guideline (TGs)</i> <i>Number</i>	Название теста <i>Test</i>	Сроки <i>Deadlines for</i>		
		утверждения <i>Adoption</i>	пересмотра <i>Revision</i>	отмены <i>Removal</i>
Недавно пересмотренные рекомендации <i>Recently revised TGs</i>				
471	Учет обратных генных мутаций у бактерий (тест Эймса) <i>Bacterial reverse mutation test (Ames test)</i>	1983	1997	–
473	Тест на индукцию хромосомных aberrаций <i>in vitro</i> <i>In vitro mammalian chromosomal aberration test</i>	1983	1997/2014	–
474	Микроядерный тест в эритроцитах млекопитающих <i>in vivo</i> <i>In vivo mammalian erythrocyte micronucleus test</i>	1983	1997/2014	–
475	Тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих <i>in vivo</i> <i>In vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test</i>	1984	1997/2014	–
476	Тест на индукцию генных мутаций в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> * <i>In vitro mammalian cell gene mutation test*</i>	1984	1997/2015	–
487	Микроядерный тест в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> <i>In vitro mammalian cell micronucleus test</i>	2010	2014	–
478	Тест на индукцию доминантных летальных мутаций у грызунов <i>Rodent dominant lethal assay</i>	1984	2015	–
483	Тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках сперматогоний млекопитающих <i>Mammalian spermatogonial chromosomal aberration</i>	1997	2015	–
Недавно утвержденные рекомендации <i>Recently approved TGs</i>				
488	Тест на индукцию мутаций в соматических и половых клетках трансгенных животных <i>Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assay</i>	2011	–	–
489	Тест ДНК-комет в клетках млекопитающих <i>in vivo</i> <i>In vivo mammalian alkaline comet assay</i>	2014	–	–
490	Тест на индукцию мутаций в гене тимидинкиназы в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> <i>In vitro mammalian cell gene mutation assays using the thymidine kinase gene</i>	2015	–	–
Архивные/утратившие силу рекомендации <i>Archived/invalid TGs</i>				
472	Учет обратных генных мутаций у <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli, reverse assay</i>	1983	–	1997
477	Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Sex-linked recessive lethal test in Drosophila melanogaster</i>	1984	–	2013
479	Тест на индукцию сестринских хроматидных обменов в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> <i>In vitro sister chromatid exchange assay in mammalian cells</i>	1986	–	2013
480	Тест на индукцию генных мутаций у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae, gene mutation assay</i>	1986	–	2013

³ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Health Effects.

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Номер рекомендаций <i>Test Guideline (TGs) Number</i>	Название теста <i>Test</i>	Сроки <i>Deadlines for</i>		
		утверждения <i>Adoption</i>	пересмотра <i>Revision</i>	отмены <i>Removal</i>
481	Тест на индукцию митотической рекомбинации у <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae, mitotic recombination assay</i>	1986	–	2013
482	Тест на внеплановый синтез ДНК в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> <i>DNA damage and repair, unscheduled DNA synthesis in mammalian cells in vitro</i>	1986	–	2013
484	Спот-тест на мышах <i>Mouse spot test</i>	1986	–	2013
485	Тест на мутации в специфических локусах мышей <i>Mouse heritable translocation assay</i>	1986	–	–
486	Тест на внеплановый синтез ДНК в клетках печени млекопитающих <i>in vivo</i> <i>Unscheduled DNA synthesis test with mammalian liver cells in vivo</i>	1997	–	–

Примечание. «–» – не применимо.

* После пересмотра TG 476 включает только тест по учету генных мутаций в локусах *hprt* или *xprt*.

Note. – *not applicable*.

* After the revision, TG 476 is only for the mammalian cell gene mutation test using the *hprt* or *xprt* loci.

Тесты, упомянутые в таблице 1, используются в регуляторных исследованиях. Они объединяются в схемы тестирования, совокупные результаты которых позволяют охарактеризовать генотоксический профиль тестируемого ЛС.

В соответствии с требованиями, изложенными в отечественном руководстве по доклиническим исследованиям (ДКИ)⁴, до начала фазы I клинических исследований (КИ) в рамках изучения специфических видов токсичности ЛС проводится исследование их мутагенной активности и потенциальной канцерогенности в краткосрочных тестах (рис. 1). Общим этапом этих исследований является оценка индукции генных мутаций на бактериях (тест Эймса) или *D. melanogaster* и хромосомных повреждений *in vivo* методом анализа хромосомных aberrаций (ХрА) в клетках костного мозга на стадии метафазы или учета микроядер (МЯ) в клетках костного мозга или периферической крови грызунов. Оценка потенциальной канцерогенной активности включает проведение дополнительно к указанным тестам на индукцию повреждений ДНК *in vivo*. С этой целью рекомендовано использование метода анализа внепланового синтеза ДНК в клетках печени,

щелочной элюции и внедренного в последней версии руководства метода ДНК-комет⁵. В совокупности указанная схема по набору тестов и методологии тестирования соответствует принятой в международной практике доклинической оценки генотоксичности ЛС. Отличие состоит лишь в том, что перед проведением фазы III КИ предполагается тестирование методом учета доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в половых клетках млекопитающих.

При получении отрицательных результатов во всех тестах или положительных результатов по меньшей мере в двух тестах выносится соответствующее заключение об отсутствии или наличии у ЛС генотоксичности и, соответственно, канцерогенного потенциала. Если положительный результат выявляется в одном из тестов, проводится дополнительное исследование с использованием альтернативного теста, регистрирующего тот же тип генотоксического события. В случае подтверждения положительного результата исследование далее не проводится, в случае отрицательного результата переходят к заключительному этапу с использованием одного из прямых экспресс-тестов определения канцерогенности, к примеру учета опухолевой

⁴ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

⁵ ICH S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. EMA/CHMP/ICH/126642/2008.

Руководство по доклиническим исследованиям, 2012
 Pre-clinical research guidelines, 2012

ICH M3(R1); ICH S2(R1)

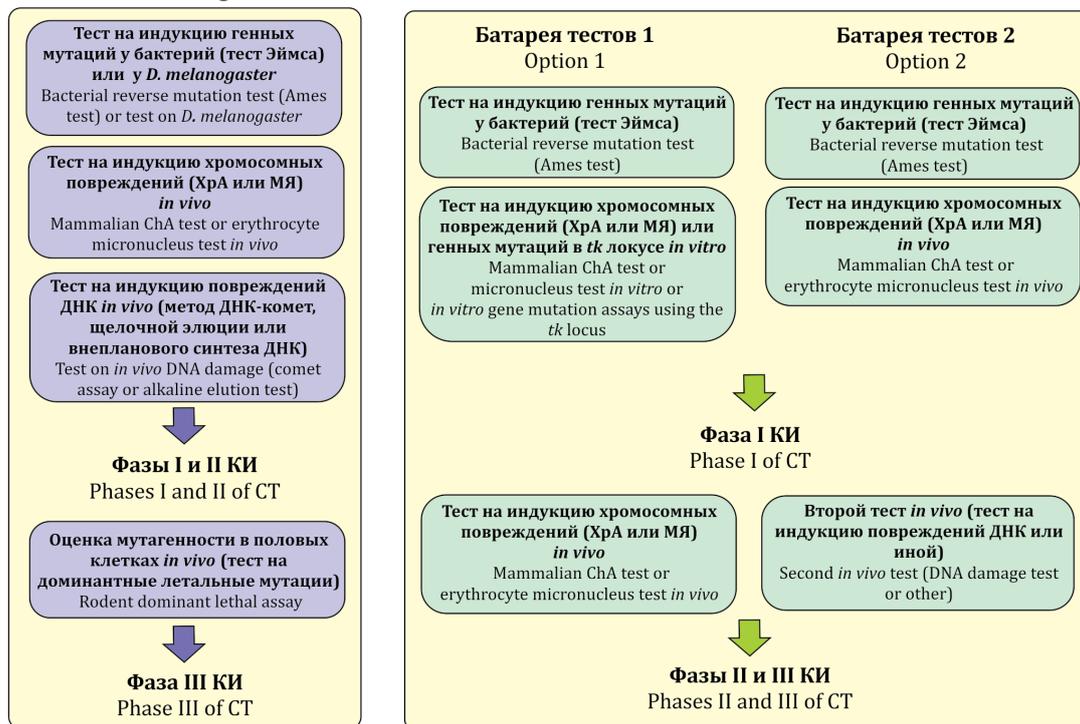


Рис. 1. Стратегии (схемы) проведения исследований по оценке генотоксичности лекарственных средств согласно отечественным⁶ и международным⁷ регуляторным требованиям (КИ – клинические исследования; ХрА – тест на хромосомные aberrации; МЯ – микроядерный тест)

Fig. 1. Strategies (schemes) for genotoxicity testing of medicinal products according to the Russian⁶ and international⁷ requirements (CT—clinical trials; ChA—chromosomal aberrations test)

трансформации клеток *in vitro*. При получении экспериментальных результатов, не позволяющих с полной определенностью сделать заключение о генотоксической активности, на фазе III КИ проводится исследование методами учета хромосомных aberrаций и (или) повреждений ДНК в клетках периферической крови пациентов.

Актуальная на сегодня программа ICH по испытанию ЛС на генотоксическую активность построена по принципу ступенчатого тестирования и определяется совместными требованиями руководств ICH S2(R1) и M3(R2)⁸ [9]. Набор тестов, методология проведения и экспертиза результатов исследований определена в руководстве S2(R1), заменившем руководства S2A и S2B. Порядок проведения исследований в зависимости от этапа/фазы КИ в числе других видов

токсикологических исследований регламентируется мультидисциплинарным руководством M3(R2).

Согласно правилам M3(R1) для проведения КИ с введением ЛС в дозах, составляющих суммарно ≤ 100 мкг ($\leq 1/100$ от NOAEL⁹ или фармакологически активной) или ≤ 500 мкг (не более 5 введений; каждая доза $\leq 1/100$ от NOAEL или фармакологически активной), тестирование на генотоксичность не проводится. Перед КИ с однократным введением ЛС в субтерапевтических или ожидаемых терапевтических дозах достаточной считается оценка генотоксического потенциала в тесте Эймса или альтернативном в случае его неприменимости. КИ с многократным введением ЛС могут быть проведены при наличии данных о его цитогенетической

⁶ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.
⁷ ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995.
⁸ ICH S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. EMA/CHMP/ICH/126642/2008.
 ICH M3 (R2) Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. EMA/CPMP/ICH/286/1995.
⁹ No Observed Adverse Effect Level – доза без наблюдаемого отрицательного эффекта.

активности, полученных в тесте по учету хромосомных нарушений *in vitro* или *in vivo*. До начала фазы II КИ оценка генотоксичности должна быть завершена в полном объеме. При этом в документе дается отсылка на утратившее силу руководство S2B, поскольку на момент утверждения M3(R2) обновленное руководство S2(R1) находилось на стадии разработки.

В соответствии с S2B батарея обязательных тестов включает тест Эймса, *in vitro* тест на индукцию хромосомных нарушений в клетках млекопитающих (или генных мутаций в *tk* локусе клеток мышинной лимфомы) и тест на индукцию хромосомных нарушений в клетках грызунов *in vivo*. Если при неприменимости теста Эймса в качестве альтернативы определено проведение двух *in vitro* тестов с детекцией различных типов генотоксических событий в клетках млекопитающих, то выбор цитогенетического теста перед фазой I КИ с многократным введением документом не регламентируется и выбор остается за разработчиком ЛС. Анализ опыта доклинических исследований в странах – участниках ИСН показывает, что исследователи предпочитают проведение *in vitro*, и *in vivo* исследований [10]. Причиной является низкая специфичность *in vitro* тестов, результаты которых зачастую могут быть неоднозначными, требующими дальнейшей верификации в расширенных исследованиях *in vivo* [11]. Аргументом также выступает «методологическое удобство» проведения микроядерного анализа *in vivo* одновременно на животных, задействованных в предшествующем фазе I КИ эксперименте по оценке хронической токсичности при 2-недельном введении [11].

В 2006 г. экспертной рабочей группой ИСН по вопросам безопасности была начата разработка нового усовершенствованного руководства на основе научных и методических достижений и с учетом результатов практики применения стратегий S2A и S2B. В итоге длительных обсуждений была разработана компромиссная версия руководства S2(R1), согласованная исполнительным комитетом ИСН в 2011 г. и принятая регуляторными органами регионов ИСН в 2012 г.

Обновленное руководство S2(R1) предусматривает возможность проведения исследований генотоксичности с использованием двух взаимозаменяемых батарей тестов (options). Первая батарея тестов (option 1) полностью соответствует принятой в руководстве S2B, что отчасти разрешает отмеченную выше регуляторную

коллизия, когда руководство M3(R2) ссылается на утративший силу документ. Вторая батарея (option 2) включает тест Эймса и два *in vivo* теста, позволяющих оценить различные типы генотоксических событий в двух разных органах/тканях, как правило, цитогенетический тест в клетках костного мозга и тест на индукцию поврежденный ДНК в клетках печени. Хотя руководство M3(R2) прямо не определяет порядок проведения *in vivo* исследований в случае выбора батареи 2, предполагается, что к началу фазы I КИ с многократным введением ЛС должен быть проведен цитогенетический тест.

В S2(R1), как и в предыдущих версиях руководства, не регламентирована стратегия последующих исследований при выявлении у ЛС мутагенности в тесте Эймса. Ввиду высокой степени корреляции мутагенной активности в тесте Эймса с канцерогенностью *in vivo* целесообразным считается прекращение дальнейшей разработки ЛС. При выявлении положительного результата в тесте *in vitro* на клетках млекопитающих (option 1) проводят дополнительное исследование *in vitro* с учетом предполагаемых механизмов наблюдаемых эффектов и возможных методических артефактов (mechanistic information). Если результаты исследования однозначно свидетельствуют в пользу отсутствия генотоксического потенциала, тестирование ЛС завершают проведением одного *in vivo* теста. В противном случае требуется проведение двух *in vivo* тестов, т.е., по сути, переход ко второй схеме тестирования (option 2). При выявлении положительных результатов в *in vivo* тесте(ах) разработка ЛС может быть продолжена при соответствующем обосновании «польза – риск» на основе данных расширенных генотоксикологических исследований.

Таким образом, отличительной особенностью международных требований к доклинической оценке генотоксичности ЛС по сравнению с отечественными является возможность поэтапного тестирования в зависимости от дозы/режима применения и фазы КИ, а также отсутствие необходимости отдельных исследований в половых клетках. Такая стратегия позволяет существенно сократить временные и ресурсные затраты в случае ЛС, неперспективных для дальнейшей разработки по результатам доклинических или клинических исследований. Кроме того, она согласуется с директивой о гуманизации экспериментальных исследований с использованием лабораторных животных 3R (Replacement, Reduction, Refinement) [11].

На сегодня в Российской Федерации в области ДКИ ЛС ведется активная работа по внедрению новых межгосударственных стандартов в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), в первую очередь с целью гармонизации норм и правил с международными регламентирующими документами. Важно подчеркнуть, что действующая методология и методическая база тестирования на генотоксичность не имеет принципиальных отличий от международных, что значительно облегчает переход отечественных экспертных лабораторий на обновленные схемы тестирования. Так, например, новейший метод оценки генотоксичности, метод ДНК-комет, в отечественное руководство по ДКИ¹⁰ был введен за два года до его внесения в список тестов, рекомендованный OECD¹¹.

Совершенствование стратегии тестирования

Описанные выше схемы тестирования доказали свою пригодность и эффективность. Однако сколь велико бывает разочарование исследователя и сколь высоки материальные потери, когда практически готовое ЛС отклоняется от дальнейшей разработки по причине его генотоксичности. В этой связи представляется, что генотоксикологические исследования следует начинать как можно раньше, привязывая их к этапам жизненного цикла ЛС. Такой подход перекликается с идеей многоуровневого тестирования, предполагающего как можно более раннее использование генотоксических тестов, в том числе альтернативных, не входящих в основной список батареи генотоксических тестов и (или) методы *in silico* [8]. Предлагаемая усовершенствованная оценка генотоксичности ЛС представлена на рисунке 2. Самые первые, пилотные исследования на генотоксичность целесообразно проводить еще на этапе фармакологического скрининга. Это позволит исключить из выборки генотоксические вещества-кандидаты в случае отсутствия перспективности их дальнейшей разработки и избежать таким образом затрат на проведение полного цикла токсикологических исследований в рамках ДКИ.

При получении на первом этапе отрицательных результатов (отсутствие генотоксичности) предполагается выполнение в рамках комплекса ДКИ всех тестов на генотоксичность, регламентированных вышеописанными схемами

тестирования (рис. 1). Для углубленной оценки риска и исключения ложных заключений в случае получения на этом этапе слабо выраженных, плохо воспроизводимых, не имеющих дозовой зависимости результатов, предусматривается продолжение генотоксикологических исследований в ходе фаз I и II КИ с использованием малоинвазивных методов.

Таким образом, использование предлагаемой стратегии не входит в противоречие с существующими формальными требованиями, но расширяет возможности предупреждения непродуктивных усилий при разработке ЛС, перспективных в силу генотоксических характеристик.

При разборе представленной схемы (рис. 2) требует обсуждения ряд вопросов.

1) Тест Эймса или тимидинкиназный тест? Тест Эймса хорошо известен с 1975 г. после публикаций, в которых по результатам испытаний более 300 химических соединений было сделано заключение о его высокой надежности для выявления генотоксических химических канцерогенов [12, 13]. С конца 70-х годов прошлого столетия данный тест входит в качестве базового во все батареи тестирования на генотоксичность. Однако было показано, что прогностическая способность теста Эймса неоднозначна. При случайной выборке соединений разных химических классов с его помощью обнаруживается 60% генотоксикантов, являющихся канцерогенами для грызунов. В случае полициклических ароматических углеводородов или гетероциклических аминов эта величина приближается к 100%, но составляет лишь 20% в отношении хлорсодержащих органических соединений [14, 15]. Его главные недостатки – использование прокариотических тест-объектов *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli*, нефизиологическая метаболическая активация соединений микросомами млекопитающих, высокий процент ложных результатов при оценке отдельных классов химических соединений, невозможность испытания веществ с антибактериальной активностью.

Тимидинкиназный тест (*tk*-тест) на клетках мышиной лимфомы L5178Y (mouse lymphoma assay, MLA) или на лимфобластных клетках человека (TK6), а также сходные тесты на клеточных линиях CHO, AS52, V79 китайского хомячка и др.

¹⁰ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

¹¹ Test No. 489: In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. Paris: OECD Publishing; 2014. <https://doi.org/10.1787/9789264224179-en>

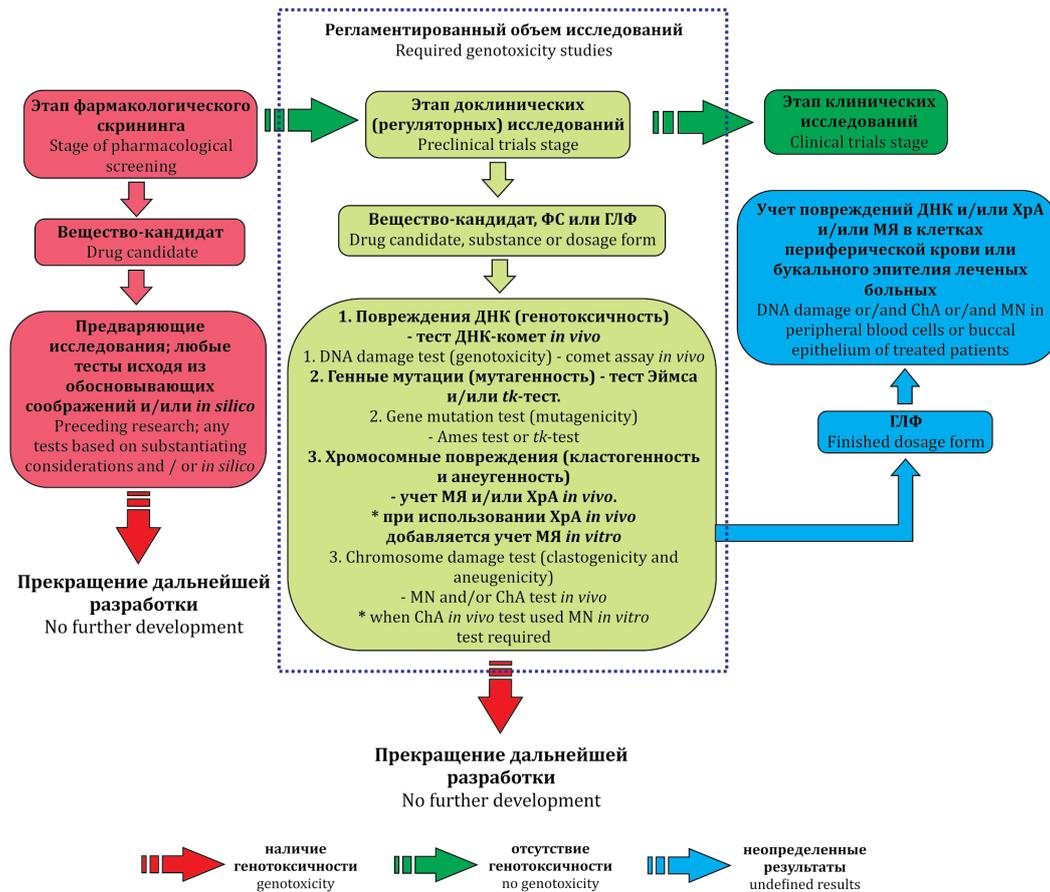


Рис. 2. Усовершенствованная стратегия оценки генотоксичности лекарственных средств (ХрА – тест на хромосомные аберрации; МЯ – микроядерный тест; ГЛФ – готовая лекарственная форма)

Fig. 2. Updated strategy for medicinal products genotoxicity testing (ChA—chromosomal aberrations test; MN—erythrocyte micronucleus test)

имеют тот же недостаток – необходимость нефизиологической метаболической активации и единичный локус оценки, в рассматриваемом случае – ген тимидинкиназы. Вместе с тем если тест Эймса в высшей степени верифицирован и отработан, вплоть до возможности его проведения на стандартизированных коммерческих наборах без необходимости в привлечении бактериологической лаборатории, тесты на эукариотических клетках верифицированы в значительно меньшей степени, более длительны, трудоемки и требуют определенных компетенций у персонала. Очевидно, что предпочтение, в особенности для пилотной оценки генотоксичности на этапе фармакологического скрининга, следует отдавать тесту Эймса.

2) Микроядерный тест или тест на хромосомные аберрации? Микроядра образуются либо в результате анеугенеза, либо в результате кластогенеза. По отношению к последнему они вторичны, так как образуются из ацентрических фрагментов хромосом. Отсюда очевидно,

что для оценки именно кластогенной активности целесообразнее использовать учет хромосомных аберраций. Его недостатки – высокие требования к квалификации персонала, отсутствие автоматизации, учет только структурных изменений хромосом. Микроядерный тест лишен этих недостатков, может быть автоматизирован и позволяет интегративно оценить кластогенные и анеугенные события. Отсюда очевидно, что в целях скрининга, не предполагающего изучение механизма повреждающего действия, микроядерный тест предпочтительнее. Тест по учету хромосомных аберраций целесообразно использовать в уточняющих исследованиях, чтобы дифференцировать кластогенный и анеугенный механизмы индукции микроядер.

3) In vitro или in vivo? В случае рассмотрения предлагаемой стратегии (рис. 2) подобная альтернатива возникает только при использовании *in vivo* теста на хромосомные повреждения. Но проблема существенно шире. Анализ литературы показывает, что при общем стремлении

свести к минимуму использование животных в медико-биологических экспериментах (принцип 3R) и задаче отказаться от применения животных в экспериментах к 2035 г.¹² результаты, полученные *in vivo*, имеют приоритет над результатами *in vitro*¹³. Кроме того, не следует забывать, что согласно третьему пункту Нюрнбергского кодекса, одного из основополагающих международных документов, принятого Нюрнбергским трибуналом в августе 1947 г.: «Эксперимент должен основываться на данных, полученных в лабораторных исследованиях на животных...», что всегда может оказаться решающим аргументом для регуляторных ведомств.

Среди наиболее общих проблем исследований *in vitro* в генотоксикологическом эксперименте [16] следует отметить:

- методические сложности в случае с мало- или нерастворимыми соединениями;
- трудности экстраполяции при отсутствии соответствия условиям гомеостаза в организме, не учитываются системные (центральная нервная и эндокринная системы), метаболические реакции, взаимодействия систем и др.;
- низкая прогностическая способность (40–70%);
- плохая воспроизводимость и многочисленные ложные результаты.

Таким образом, предпочтение, несомненно, должно быть отдано тестам *in vivo*. Однако в случаях, когда исследователь не располагает сведениями о биораспределении вещества в организме, т.е. не может однозначно указать на его присутствие в области анализируемой ткани и (или) использован метод учета хромосомных aberrаций, возникает необходимость дополнения тестов *in vivo* тестом по учету микроядер *in vitro* (рис. 2).

4) Что тестировать: вещество-кандидат, фармацевтическую субстанцию или препарат в готовой лекарственной форме (ГЛФ)? Выбор объекта тестирования в случае проведения исследований *in vitro* очевиден. Входящие в состав многих ГЛФ вспомогательные вещества (наполнители, стабилизаторы, пролонгаторы и т.д.), как правило, плохо- или нерастворимы в воде и (или) в применимых для клеточных культур растворителях, что значимо снижает

технически достижимую высшую тестируемую концентрацию действующего вещества в тест-системе. Кроме того, вспомогательные вещества, в том числе в инъекционной или назальной лекарственных формах, могут в *in vitro* системе либо оказывать непосредственное воздействие на клетки, приводя к неконтролируемым нежелательным эффектам, либо препятствовать проникновению целевой молекулы в клетки.

В случае *in vivo* тестов выбор объекта тестирования не столь очевиден. С одной стороны, при планируемом в клинике пути введения вещества в виде ГЛФ может иметь большую биодоступность, что и является целью в исследованиях по разработке состава ГЛФ. С другой стороны, как и в случае с *in vitro* исследованиями, наличие вспомогательных веществ ограничивает технически достижимую высшую тестируемую дозу вещества, в особенности когда содержание действующего вещества в ГЛФ мало. За исключением, возможно, интрагастрального пути, введение животным рекомендуемой высшей тестируемой дозы 1/10–1/2 ЛД₅₀ (или 2000 мг/кг для нетоксичных веществ) становится сложно выполнимой задачей. При этом *per se* введение большого количества вспомогательных веществ может приводить к неспецифическим местным реакциям и, как следствие, к искажению результатов. Исходя из этого для *in vivo* тестов целесообразным представляется неформализованный подход, предусматривающий в каждом конкретном случае обоснованный выбор формы тестируемого вещества-кандидата в зависимости от метода исследования, тест-системы, дозы, пути и режима введения.

Альтернативы тестов, представленные на рисунке 2, правильно рассматривать не как взаимоисключающие, а скорее как взаимодополняющие, например неопределенные данные в тесте Эймса можно проверить в *tk*-тесте, неопределенные данные в микроядерном тесте проверить с учетом ХрА и на этом основании расшифровать кластогенную или анеугенную природу МЯ.

В обозримом будущем перспективным выглядит внедрение в практику теста Pig-a – *in vivo* теста, основанного на оценке индукции генных мутаций в гене *PIGA*, приводящих к нарушению синтеза гликозилфосфатидинозитола – якорного

¹² US Environmental Protection Agency Memorandum. Washington, D. C. 20460; 2019. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-09/documents/image2019-09-09-231249.pdf>

¹³ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

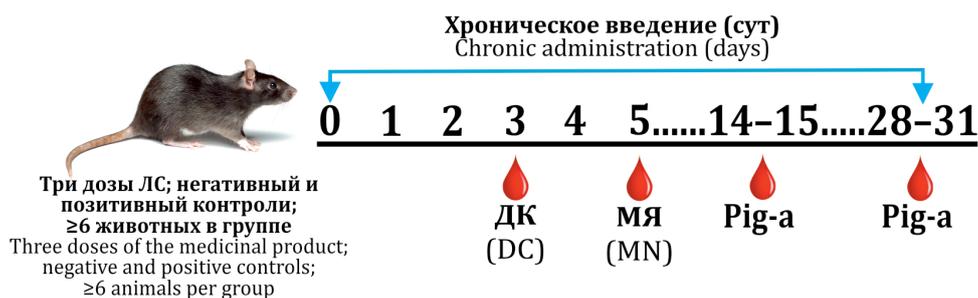


Рис. 3. Схема проведения тестирования лекарственных средств (ЛС) на генотоксичность по трем конечным точкам: ДК – тест ДНК-комет, МЯ – микроядерный тест и тест Pig-a в рамках хронического токсикологического эксперимента

Fig. 3. Scheme for assessing genotoxicity of medicinal products by three endpoints: DC–DNA comet assay, MN–erythrocyte micronucleus test and Pig-a assay within a chronic toxicity study

белка мембраны эритроцитов [17]. На сегодняшний день на завершающем этапе находится разработка экспертной группой OECD методических указаний по проведению теста Pig-a в целях генотоксикологической оценки¹⁴. Помимо возможности оценки индукции генных мутаций *in vivo*, преимуществами этого теста являются минимальное количество требуемого биоматериала и цитофлуориметрический метод оценки результатов, что позволяет отслеживать эффекты в динамике. Приведенные выше *in vivo* методы (рис. 2), микроядерный тест и метод ДНК-комет, также выполнимы на малом объеме биоматериала, и, следовательно, перспективной представляется схема тестирования, объединяющая все три теста в один эксперимент, в идеале интегрированный в хронический токсикологический (рис. 3). Такая схема тестирования имеет ряд очевидных преимуществ, среди которых значительная экономия затрат на лабораторных животных и, соответственно, максимальная реализация принципов 3R, возможность одновременной оценки и сопоставления данных по трем конечным точкам (end-points) у одних и тех же животных.

В более отдаленной перспективе не исключено применение для выявления генных мутаций новых технологий секвенирования следующего поколения с исправлением ошибок (Error-Corrected Next Generation Sequencing, EC-NGS), которые позволяют выявлять мутации в любом месте генома или во всем геноме [18]. Предполагается, что их применение обеспечит более адекватные оценки частоты мутаций и будет в состоянии оценить мутацию генов в любой ткани любого животного. Эти новейшие методы имеют большие перспективы, но они требуют дальнейшей разработки и валидации, прежде

чем их можно будет использовать для регуляторных целей [19, 20].

Несомненным достижением прикладных генотоксикологических исследований в соматических клетках является доказанная прогностическая значимость их результатов для оценки потенциальной канцерогенности. Данные по чувствительности и специфичности генотоксических тестов в прогнозе канцерогенности обобщены из нескольких источников [21–24] и представлены в таблице 2. В совокупности с тестами на клеточную трансформацию *in vitro*, позволяющими детектировать негенотоксические канцерогены, краткосрочные тесты на генотоксичность в перспективе могут послужить альтернативой стандартному двухлетнему биотестированию на канцерогенность на грызунах [3].

Интерпретация результатов генотоксикологических исследований лекарственных средств

Сегодня нет общепринятого взгляда на трактовку результатов генотоксического тестирования. Наиболее простой и логичной с точки зрения регуляторных исследований выглядит трактовка результатов, предлагаемая в работе [25]. Ее авторы выделяют:

- очевидное доказательство – тестируемое соединение проявило эффекты *in vivo* на млекопитающих или на многих организмах;
- приблизительное доказательство – соединение показало положительные результаты в *in vitro* тестах при условии исключения ложноположительных результатов вследствие экстремальных условий культивирования (изменение pH, увеличенная

¹⁴ Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay. Draft OECD guideline for the testing of chemicals. 2021.

Таблица 2. Предикция канцерогенности на основе комбинаций тестов на генотоксичность [21–24]

Table 2. Prediction of carcinogenicity using combinations of genotoxicity tests [21–24]

Комбинация тестов <i>Combination of tests</i>	Чувствительность, % <i>Sensitivity, %</i>	Специфичность, % <i>Specificity, %</i>
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> <i>Ames test + MN in vitro</i>	73	12–37
Тест Эймса + MLA <i>Ames test + MLA</i>	81–89	32
Тест Эймса + MLA + ХрА <i>in vitro</i> <i>Ames test + MLA + ChA in vitro</i>	84	23
Тест Эймса + MLA + МЯ <i>in vitro</i> <i>Ames test + MLA + MN in vitro</i>	91	5
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> + МЯ <i>in vivo</i> <i>Ames test + MN in vitro + MN in vivo</i>	80	21
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> + TGR <i>Ames test + MN in vitro + TGR</i>	89	–
Тест Эймса + МЯ <i>in vivo</i> + TGR <i>Ames test + MN in vivo + TGR</i>	87	–
Тест Эймса + МЯ <i>in vitro</i> + МЯ <i>in vivo</i> + TGR <i>Ames test + MN in vivo + МЯ in vitro + TGR</i>	89	–
Тест Эймса + TGR <i>Ames test + TGR</i>	84	–
Тест Эймса + ДНК-комет <i>in vivo</i> <i>Ames test + comet assay in vivo</i>	90	–
Тест Эймса + МЯ <i>in vivo</i> <i>Ames test + MN in vivo</i>	78	–
MLA + МЯ <i>in vitro</i> <i>MLA + MN in vitro</i>	87	10
MLA + ХрА <i>in vitro</i> <i>MLA + ChA in vitro</i>	89	27
ХрА <i>in vivo</i> + МЯ <i>in vivo</i> <i>ChA in vivo + MN in vivo</i>	88	–
МЯ <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vivo</i> <i>MN in vivo + comet assay in vivo</i>	92–94	–
ХрА <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vivo</i> <i>ChA in vivo + comet assay in vivo</i>	97	–
МЯ <i>in vivo</i> + TGR <i>MN in vivo + TGR</i>	94	–
МЯ <i>in vivo</i> + Pig-A <i>MN in vivo + Pig-A</i>	93	–
МЯ <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vitro</i> <i>MN in vivo + comet assay in vitro</i>	96	–
ХрА <i>in vivo</i> + ДНК-комет <i>in vitro</i> <i>ChA in vivo + comet assay in vitro</i>	91*	–

Примечание. МЯ – микроядерный тест; ХрА – тест на хромосомные aberrации; MLA – тест на клетках мышиной лимфомы; TGR – совокупно тесты на индукцию мутаций в специфических локусах у трансгенных животных (*Muta*TM, *Big Blue*®, *lacZ*, *gpt delta*); «–» – данные отсутствуют.

* Положительный результат для 4 негенотоксичных канцерогенов в тесте ДНК-комет.

Note. MN – micronucleus test; ChA – chromosome aberration test; MLA – mouse lymphoma assay; TGR – tests for induction of mutations at specific loci in transgenic rodents (*Muta*TM, *Big Blue*®, *lacZ*, *gpt delta*); – no data available.

* Positive results for 4 non-genotoxic carcinogens in comet assay.

- осмолярность и пр.) или повышенной цитотоксичности;
- недостаточное доказательство — эффект выявлен, но использован не полный набор тестов или эффект наблюдается в исследованиях, выполненных с отклонениями от принятых протоколов. При таких обстоятельствах результаты потребуют подтверждений в исследованиях, дизайн и выполнение которых не вызывают вопросов;
 - сомнительное (неопределенное) свидетельство — данные получены адекватными методами, но их нельзя однозначно классифицировать как положительные или отрицательные. То есть в одном или нескольких проведенных тестах имеются «пограничные» отличия от данных негативного контроля. Если «пограничный» ответ сохраняется в повторных исследованиях, то ответ может быть не определен вне зависимости от того, сколько бы повторов ни проводилось. Такой случай, при условии доказательства отсутствия ошибок определения, классифицируется как «неопределенное свидетельство»;
 - положительное свидетельство — положительные результаты, полученные с помощью хорошо проведенных, валидированных тестов делятся на три категории: возможный мутаген для человека, вероятный мутаген для человека и мутаген для человека;
 - возможный мутаген для человека — в отдельных тестах батареи выявлены положительные результаты. Например, подтвержденные положительные результаты в тестах *in vitro* при отсутствии таковых *in vivo*. Соединения, попадающие в эту категорию, рассматриваются как потенциальные мутагены, не проявляющиеся *in vivo*;
 - вероятный мутаген для человека — соединение, показавшее положительные результаты *in vivo*. Предполагается, что тесты *in vivo* проводятся после получения положительных результатов *in vitro*;
 - мутаген для человека — получены положительные данные в эпидемиологических или клинических исследованиях, предполагающих получение положительных эффектов на соматических клетках человека, выявленные в результате документированного воздействия агента *in vivo*;
 - отрицательное свидетельство — отсутствие эффектов на принятых тестах стандартной батареи с учетом структурных особенностей соединения, его метаболизма и механизма

действия, а также с учетом других данных, не обнаружены мутагенные/генотоксические свойства. В этом случае считается, что тестируемое соединение не обладает мутагенной активностью. Авторы работы [3] отмечают, что «...такое заключение выносятся, когда данные всех исследований отрицательны, клеточные культуры или животные подверглись воздействию соединения в субтоксической или максимальной дозе, и результаты не отличаются значимо от негативного контроля. При оценке риска развития онкопатологий отрицательное свидетельство о мутагенных/генотоксических свойствах не исключает возможности того, что если при исследовании на индукцию канцерогенеза у соединения наблюдались канцерогенные свойства, то причиной этого могут быть иные, не связанные с генотоксичностью механизмы».

Очевидно, что при планировании экспериментов конечной целью следует обозначать получение «очевидных доказательств» или «отрицательных свидетельств».

Не разбирая возможные примеры возникновения противоречивых и неопределенных результатов, подчеркнем, что биологический эффект может считаться достоверно доказанным в случае воспроизводимости в независимых сериях экспериментов и (или) получении отчетливой дозовой зависимости эффекта. В соответствии с последним на первый план выходит необходимость анализа дозовых зависимостей проявления генотоксических эффектов *in vivo*, без которого невозможна оценка соотношения «польза — риск» клинического применения генотоксиканта.

Сама по себе постановка вопроса о потенциальном риске применения генотоксикантов, прослеживающаяся в современной литературе [25]¹⁵, предполагает, что выявление генотоксичности не означает автоматической выбраковки вещества-кандидата из разработки. Наличие выраженных порогов действия ряда генотоксикантов предполагает возможность их применения в области безопасных дозировок. Вместе с тем рассмотрение этого вопроса требует большой осторожности в связи с недостаточностью знаний. С нашей точки зрения проблемы оценки соотношения «польза — риск» и экстраполяции (трансляции) экспериментальных данных на человека

¹⁵ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

имеют самостоятельное научное значение и могут быть решены только на основе фундаментальных исследований. Среди них, во-первых, исследования, направленные на освещение вопросов тканеспецифичности мутагенеза, роли генетических полиморфизмов в формировании индивидуальной чувствительности к действию мутагенов, закономерностей «доза–эффект» терапевтического и генотоксического действия на основе дешифровки межвидовых особенностей проявления эффектов и выявления пороговости или беспороговости их становления, выявление значимости разных маркеров генотоксичности для оценки возможных рисков.

Перспективы развития генотоксикологии лекарственных средств

Сегодня ни одна схема генотоксического тестирования не предлагает решения насущной проблемы регистрации генотоксических эффектов в половых (генеративных) клетках. Согласно требованиям ICH регистрация генотоксических эффектов в половых клетках не входит в перечень обязательных исследований при доклинических испытаниях ЛС. Считается, что генотоксиканты для половых клеток с высокой степенью вероятности выявляются в тестах на соматических клетках и отсутствие генотоксичности *in vivo* предполагает ее отсутствие в том числе и в половых клетках [26]¹⁶.

Вместе с тем на сегодня ведущие специалисты в области генотоксикологии сходятся во мнении, что, несмотря на высокую прогностическую эффективность, результаты тестов на соматических клетках не могут служить надежным предиктором генотоксических эффектов в половых [27]. Согласно исследованиям последних лет, наряду с особенностями процессов клеточного деления при гаметогенезе половые клетки и их предшественники характеризуются специфичными протеомным, транскриптомным, метаболомным профилями, а также путями эпигенетической регуляции, что предполагает наличие уникальных для них мишеней генотоксического воздействия [27, 28]. Примечательно, что в комментариях руководства S2A¹⁷ отмечалась вероятность существования специфичных для половых клеток генотоксикантов, в первую очередь анеугенов, однако данный комментарий был удален из обновленного документа S2(R1).

Решение проблемы регистрации генотоксических эффектов в половых (генеративных) клетках затруднено отсутствием адекватной методологической базы. Имеющиеся методы обладают низкой специфичностью и (или) производительностью, дорогостоящи либо в недостаточной степени валидированы, что затрудняет их рутинное применение в экспертной генотоксикологической оценке. Важным недостатком этих методов является использование в качестве тест-объекта исключительно самцов при имеющихся экспериментальных свидетельствах особенностей процессов спонтанного и индуцированного мутагенеза в мужских и женских половых клетках [29, 30]. В ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» усовершенствована и успешно апробирована методика цитогенетического анализа в ооцитах мышей [31], которая может быть внедрена в доклиническую оценку генотоксичности лекарств. Важной задачей является дальнейшее развитие исследований по разработке методов регистрации генотоксических событий в генеративных клетках.

Несмотря на наличие регламентирующих указаний, практического решения до сих пор не найдено для оценки генотоксических рисков применения генотерапевтических средств. Вопрос о потенциальной возможности вертикального переноса целевой последовательности ДНК и (или) векторных последовательностей в генеративные клетки, а также вероятность инсерционного мутагенеза и канцерогенеза в результате применения этих средств в методическом плане остается открытым.

Аналогичным образом требует решения проблема генотоксичности по отношению к митохондриальной ДНК (мтДНК). Мутации в митохондриях, унаследованные по материнской линии или приобретенные *de novo*, являются источником широкого спектра митохондриальных патологий. Однако должные методы оценки индукции повреждений мтДНК не разработаны. Решение этого вопроса возможно на методике оценки первичных повреждений в мтДНК, основанной на применении полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

На различных этапах теоретической и (или) экспериментальной проработки находятся вопросы оценки генетической безопасности применения

¹⁶ ICH S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. EMA/CHMP/ICH/126642/2008.

¹⁷ ICH S2A Note for Guidance on Genotoxicity: Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. CPMP/ICH/141/95.

технологий геномного редактирования, однако конкретных предложений для решения этих задач на сегодня нет.

Недостаточно разработана проблема возможного влияния генотоксикантов на эпигенетическую регуляцию генома.

К важнейшим фундаментально-ориентированным исследованиям следует отнести изучение механизмов мутагенеза. К примеру, выявление и доказательство опосредованности повреждающих эффектов существенной части генотоксикантов через продукцию экзогенных свободных радикалов (окислительный стресс), представленных активными формами кислорода, переориентировало фокус генотоксикологических исследований с беспороговой модели поражающего действия на пороговую модель, предполагающую относительную безопасность генотоксикантов вне прооксидантных дозировок.

Не менее значимыми с фундаментальной точки зрения являются исследования, направленные на изучение экзогенной регуляции сигнальных и репарационных клеточных систем. Среди первых особенное внимание привлекает транскрипционный фактор Nrf2, рассматриваемый как главный регулятор клеточных защитных механизмов против окислительного стресса, к тому же играющий существенную роль в репарации ДНК [32, 33]. Изучение указанного фактора и выявление новых звеньев сигналинга, направленного на цитопротекцию, могут сыграть существенную роль в понимании возможностей регуляции индуцированного мутагенеза, направленного поиска антимутагенных и комутагенных модификаторов мутагенеза [34–36].

Исследования комутагенных взаимодействий, впервые обозначенных [37] как новая проблема генотоксикологических исследований, до сих пор сведены к случайным находкам и отдельным публикациям. Например, в наших исследованиях показано комутагенное взаимодействие верапамила и рибавирина [38], комутагенные эффекты валокордина и кофеина [39, 40]. В то же время разработка проблемы комутагенеза в рамках общей темы нежелательных эффектов взаимодействия лекарств между собой и с экзогенными, в частности пищевыми, мутагенами имеет большое практическое значение. Не исключено, что накопление фактологического материала в этой области в будущем определит тестирование на комутагенность как составляющее звено в общей схеме тестирования генотоксичности ЛС.

Становление общепринятой системы оценки генотоксичности, произошедшее в начале текущего века, порождает большое количество вопросов к результатам, полученным при испытаниях ранее внедренных ЛС. В большой серии обзоров литературы, выполненных в 2007–2013 гг. под руководством G. Vrambilla [41], для примера было показано, что около половины ЛС, применяющихся сегодня, никогда не исследовались на генотоксичность или не были исследованы должным образом и характеризуются противоречивыми и (или) неопределенными результатами. Аналогичный вывод был сделан нами в отношении отдельных групп ЛС в более поздних работах [42, 43].

Таким образом, помимо оценки генотоксичности вновь регистрируемых ЛС существенной проблемой является необходимость оценки генотоксичности уже применяющихся препаратов. Она может иметь выборочный характер, основываться на данных *in silico*, указывающих на структурное сходство с известными генотоксикантами, и (или) затрагивать только ЛС, в отношении генотоксической безопасности которых имеются экспериментально подкрепленные сомнения.

Еще одной общей проблемой современной генотоксикологии ЛС является отсутствие значимых достижений в области информирования врачебной и научной общественности о генотоксичности ЛС. Большинство результатов подобных исследований остаются в распоряжении регуляторных органов и недоступны для независимого научного анализа.

Наконец, несмотря на сложившуюся международную гармонизированную систему исследований генотоксичности, имеется достаточное количество работ, выходящих за рамки протоколов исследований. Например, в исследованиях *in vitro*, помимо хорошо охарактеризованных и верифицированных к генотоксикологическим задачам лимфоцитов периферической крови, клеток китайского хомячка и других, можно встретить необычные тест-системы, в частности эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера или клетки перевиваемых линий. Часто результаты подобных исследований дискредитируют отдельные ЛС и создают напряженность во врачебном сообществе. Значимость подобных работ для характеристики генотоксического потенциала ЛС в процессе разработки и регистрации ЛС не определена, но их результаты могут служить отправной точкой

для углубленного анализа потенциальной генотоксичности того или иного препарата.

Заключение

В последнее десятилетие понимание этиопатогенетической роли генотоксических поражений генома вышло за границы наследственной и онкологической патологий. Все чаще генотоксические поражения рассматривают как наиболее общий фактор, играющий определяющую роль в развитии сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний, репродуктивных потерь, фертильности и старения. Это предопределяет актуальность и необходимость проведения генотоксических исследований и их развития во всех упомянутых регуляторных, фундаментальных и поисковых аспектах.

Следует констатировать, что в современной регуляторной практике сложилась и успешно применяется гармонизированная система тестирования генотоксичности вновь создаваемых ЛС, предупреждающая выход на рынок препаратов, не охарактеризованных с генотоксической точки

зрения. Ее развитие возможно путем разработки и внедрения более совершенных методов оценки генотоксических эффектов в генеративных клетках, генных мутаций в эукариотических клетках, расширения границ оценки генотоксичности за счет регистрации комутагенных и эпигенетических эффектов, митохондриального мутагенеза.

Обобщая вышеизложенный материал, следует констатировать, что генотоксикология ЛС является высокозначимой и необходимой частью доклинического исследования безопасности ЛС, она включает регуляторные, фундаментальные и поисковые исследования и направлена на сохранение здоровья человека. Выполнение оценки генотоксичности на доклиническом этапе разработки должно проводиться по общепринятым верифицированным и стандартизированным протоколам. Оценка генетического риска применения, в свою очередь, должна основываться на изучении дозовых зависимостей и механизмов реализации генотоксических эффектов и происходить по принципу case-by-case, поскольку генотоксический профиль каждого соединения уникален.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Дурнев АД, Жанатаев АК, Шредер ОВ, Середенина ВС. Генотоксические поражения и болезни. *Молекулярная медицина*. 2013;(3):3–19. [Durnev AD, Zhanataev AK, Shreder OV, Seredenina VS. Genotoxic events and diseases sicheskie. *Molekulyarnaya medicina = Molecular Medicine*. 2013;(3):3–19 (In Russ.)]
2. Choudhuri S, Kaur T, Jain S, Sharma C, Asthana S. A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chem Biol Interact*. 2021;345:109531. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109531>
3. Dearfield KL, Cimino MC, McCarroll NE, Mauer I, Valcovic LR. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat Res*. 2002;521(1–2):121–35. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00236-x](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00236-x)
4. Дурнев АД. Генетическая токсикология. *Вестник РАМН*. 2011;(9):35–44. [Durnev AD. Genetic toxicology. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2011;(9):35–44 (In Russ.)]
5. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res*. 1991;250(1–2):3–16. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90157-j](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90157-j)
6. Бочков НП, Шрам РИ, Кулешов НП, Журков ВС. Система оценки химических веществ для человека: общие принципы, практические рекомендации и дальнейшие разработки. *Генетика*. 1975;11(10):156–69. [Bochkov NP, Shram RI, Kuleshov NP, Zhurkov VS. Human chemical assessment system: general principles, practical recommendations and further developments. *Genetika = Genetics*. 1975;11(10):156–69 (In Russ.)]
7. Bridges BA. Some general principles of mutagenicity screening and possible framework for testing procedure. *Environ Health Perspect*. 1973;6:221–7. <https://doi.org/10.1289/ehp.7306221>
8. Steiblen G, Benthem JV, Johnson G. Strategies in genotoxicology: acceptance of innovative scientific methods in a regulatory context and from an industrial perspective. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2020;853:503171. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503171>
9. Müller L, Tweats D, Galloway S, Hayashi M. The evolution, scientific reasoning and use of ICH S2 guidelines for genotoxicity testing of pharmaceuticals. In: van der Laan JW, DeGeorge JJ, eds. *Global Approach in Safety Testing: ICH Guidelines Explained*. Springer; 2013.
10. Baldrick P. Genotoxicity test battery – an assessment of its utility in early drug development. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2021;868–869:503388. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503388>
11. Richmond J. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework. *ILAR J*. 2002;43 Suppl:S63–8. https://doi.org/10.1093/ilar.43.suppl_1.s63
12. McCann J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1976;73(3):950–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.3.950>

13. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1975;72(12):5135–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.5135>
14. Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Muller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res*. 2005;584(1–2):1–256. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.004>
15. Kirkland D, Pfuhrer S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, et al. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of an ECVAM workshop. *Mutat Res*. 2007;628(1):31–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.11.008>
16. Fischer I, Milton C, Wallace H. Toxicity testing is evolving! *Toxicol Res (Camb)*. 2020;9(2):67–80. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa011>
17. Dertinger SD, Bhalli JA, Roberts DJ, Stankowski LF, Gollapudi BB, Lovell DP, et al. Recommendations for conducting the rodent erythrocyte Pig-a assay: a report from the HESI GTTC Pig-a Workgroup. *Environ Mol Mutagen*. 2021;62(3):227–37. <https://doi.org/10.1002/em.22427>
18. Salk JJ, Kennedy SR. Next-generation genotoxicology: using modern sequencing technologies to assess somatic mutagenesis and cancer risk. *Environ Mol Mutagen*. 2020;61(1):135–51. <https://doi.org/10.1002/em.22342>
19. Heflich RH, Johnson GE, Zeller A, Marchetti F, Douglas GR, Witt KL, et al. Mutation as a toxicological endpoint for regulatory decision-making. *Environ Mol Mutagen*. 2020;61(1):34–41. <https://doi.org/10.1002/em.22338>
20. Morita T, Hamada S, Masumura K. Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;802:1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.03.008>
21. Kirkland D, Zeiger E, Madia F, Corvi R. Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? II. Construction and analysis of a consolidated database. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;775–776:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.10.006>
22. Kirkland D, Uno Y, Luijten M, Beevers C, van Benthem J, Burlinson B, et al. In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019;847:403035. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.008>
23. Elespuru R, Pfuhrer S, Aardema MJ, Chen T, Doak SH, Doherty A, et al. Genotoxicity assessment of nanomaterials: recommendations on best practices, assays, and methods. *Toxicol Sci*. 2018;164(2):391–416. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy100>
24. Goodman JI. Goodbye to the bioassay. *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(4):558–64. Erratum in: *Toxicol Res (Camb)*. 2018;7(5):994. <https://doi.org/10.1039/c8tx00004b>
25. MacGregor JT, Frötschl R, White PA, Crump KS, Eastmond DA, Fukushima S, et al. IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;783:55–65. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.09.011>
26. Adler ID, Ashby J. The present lack of evidence for unique rodent germ-cell mutagens. *Mutat Res*. 1989;212(1):55–66. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90022-5)
27. Yauk CL, Aardema MJ, Benthem J, Bishop JB, Dearfield KL, DeMarini DM, et al. Approaches for identifying germ cell mutagens: report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;783:36–54. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.01.008>
28. Дурнев АД. Анализ и значение мутаций в зародышевых клетках. *Медицинская генетика*. 2011;(2):3–11. [Durnev AD. Analysis and importance of germ cells mutations. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*. 2011;(2):3–11 (In Russ.)]
29. Adler ID, Carere A, Eichenlaub-Ritter U, Pacchierotti F. Gender differences in the induction of chromosomal aberrations and gene mutations in rodent germ cells. *Environ Res*. 2007;104(1):37–45. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.08.010>
30. Sudman PD, Generoso WM. Female-specific chemical mutagens. *Environ Mol Mutagen*. 1990;15 Suppl 17:58.
31. Плигина КЛ, Жанатаев АК, Чайка ЗВ, Дурнев АД. Методика цитогенетического анализа ооцитов мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013;156(7):128–32. [Pligina KL, Zhannataev AK, Chaika ZV, Durnev AD. Method of cytology assay of mouse oocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;156(7):128–32 (In Russ.)]
32. Турпаев КТ. Сигнальная система Keap1-Nrf2. Механизмы регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений. *Биохимия*. 2013;78(2):147–66. [Turpaev KT. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biokhimiya = Biochemistry*. 2013;78(2):147–66 (In Russ.)]
33. Shaw P, Chattopadhyay A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *J Cell Physiol*. 2020;235(4):3119–30. <https://doi.org/10.1002/jcp.29219>
34. Дурнев АД. Антимутагенез и антимутагены. *Физиология человека*. 2018;44(3):116–37. [Durnev AD. Antimutagenesis and antimutagens. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*. 2018;44(3):116–37 (In Russ.)] <https://doi.org/10.7868/S013116461803013X>
35. Дурнев АД. Фармакология мутагенеза. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(2):8–14. [Durnev AD. Pharmacology of mutagenesis. *Eksperimental'naya i*

- klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2021;84(2):8–14 (In Russ.)
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2021-84-2-8-14>
36. Дурнев АД, Середенин СБ. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. М.: Медицина; 1998. [Durnev AD, Seredenin SB. Mutagens: screening and pharmacological prevention of exposures. Moscow: Meditsina; 1998 (In Russ.)]
 37. Дурнев АД, Середенин СБ. Комутагенез – новое направление исследований в генотоксикологии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2003;135(6):604–12. [Durnev AD, Seredenin SB. Co-mutagenesis as new vistas in genotoxicology. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2003;135(6):604–12 (In Russ.)]
 38. Дурнев АД, Даугель-Дауге НО, Середенин СБ. Комутагенное взаимодействие верапамила и рибавирина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2006;69(1):56–9. [Durnev AD, Daugel'-Dauge NO, Seredenin SB. Comutagen interaction of verapamil and ribavirin. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2006;69(1):56–9 (In Russ.)]
 39. Дурнев АД, Даугель-Дауге НО, Жанатаев АК, Лапицкая АС, Середенин СБ. Комутагенные эффекты валокордина. *Экологическая генетика*. 2012;10(3):53–8. [Durnev AD, Daugel'-Dauge NO, Zhanataev AK, Lapitskaya AS, Seredenin SB. Comutagenic effects of valocordin. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics*. 2012;10(3):53–8 (In Russ.)]
 40. Дурнев АД, Кулакова АВ, Жанатаев АК, Оганесянц ЛА. Оценка цитогенетической и мутаген-модифицирующей активности кофеина в клетках костного мозга мышей. *Гигиена и санитария*. 2015;94(3):106–10. [Durnev AD, Kulakova AV, Zhanataev AK, Oganesyants LA. Evaluation of the cytogenetic and mutagen-modifying activity of caffeine in mouse bone marrow cells. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*. 2015;94(3):106–10 (In Russ.)]
 41. Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L, Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of bronchodilators and antiasthma drugs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112(5):302–13. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12054>
 42. Еремина НВ, Жанатаев АК, Лисицын АА, Дурнев АД. Генотоксические свойства гипогликемических лекарств (систематический обзор). *Экологическая генетика*. 2021;19(3):219–40. [Eremina NV, Zhanataev AK, Lisitsyn AA, Durnev AD. Genotoxic properties of hypoglycemic drugs (systematic review). *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics*. 2021;19(3):219–40 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17816/ecogen70691>
 43. Дурнев АД, Еремина НВ, Жанатаев АК, Колик ЛГ. Генотоксичность психотропных лекарств в экспериментальных и клинических исследованиях (в печати). [Durnev AD, Eremina NV, Zhanataev AK, Kolik LG. Genotoxicity of psychotropic drugs in experimental and clinical studies (article is being published) (In Russ.)]

Вклад авторов. А.Д. Дурнев – идея и написание текста рукописи, доработка текста, научное редактирование рукописи; А.К. Жанатаев – доработка текста рукописи, подготовка табличного материала и рисунков, научное редактирование рукописи.

Благодарности. Авторы благодарят старшего научного сотрудника отдела лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Н.В. Еремину за помощь в оформлении и подготовке рукописи к печати. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на проведение научных исследований по теме «Доклиническая оценка безопасности лекарств и экспериментальная разработка средств для здоровье-сбережения и профилактики заболеваний, обусловленных взаимодействием организма с неблагоприятными факторами окружающей среды» (номер государственного учета НИР 122020100334-2).

Authors' contributions. Andrey D. Durnev—elaboration of the study concept, writing, revision, and scientific editing of the text; Aliy K. Zhanataev—revision and scientific editing of the text, preparation of tables and figures.

Acknowledgements. The authors are grateful to N.V. Eremina, Senior Researcher of the Department of Medicinal Toxicology of V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, for her help in forming and preparation of the paper for publication. The study was carried out by V.V. Zakusov Institute of Pharmacology within the framework of the publicly funded research project “Drug safety preclinical assessment and experimental development of health promotion solutions and prevention of diseases caused by adverse environmental factors” (R&D public accounting No. 122020100334-2).

Конфликт интересов. А.Д. Дурнев является членом редколлегии журнала «Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств», А.К. Жанатаев заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Andrey D. Durnev 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*, Aliy K. Zhanataev declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Дурнев Андрей Дмитриевич, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>
addurnev@mail.ru

Жанатаев Алий Курманович, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7673-8672>
azhanataev@yandex.ru

Andrey D. Durnev, Corresponding Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>
addurnev@mail.ru

Aliy K. Zhanataev, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7673-8672>
azhanataev@yandex.ru

Статья поступила 23.11.2021
После доработки 22.12.2021
Принята к печати 04.03.2022

Article was received 23 November 2021
Revised 22 December 2021
Accepted for publication 4 March 2022

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Ученые Центра геномных исследований в Нью-Йорке и Нью-Йоркского Университета опубликовали в журнале *Nature* результаты скрининга около 12 000 различных генов во множестве субпопуляций Т-клеток для идентификации генов, которые смогут усиливать иммунные клетки и повышать их устойчивость и способность к уничтожению опухолевых клеток (Legut, M., Gajic, Z., Guarino, M. et al. A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation. *Nature*. 2022;603(7902):728–35. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04494-7>). Предшествующие исследования по разработке препаратов на основе Т-клеток ставили целью уничтожение определенных опухолей за счет тщательного выбора опухолеспецифичных или тканеспецифичных белков (антигенов).

За последние 30 лет FDA зарегистрировало несколько препаратов на основе Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), но остается нерешенным вопрос о значительном количестве пациентов, для которых не удастся добиться длительной ремиссии после использования терапии CAR-T клетками. Американские ученые выбрали другой подход и вместо того, чтобы модифицировать антитело, решили использовать гены, которые влияют на активность и продолжительность действия Т-клеток. Так, например, рецептор лимфотоксина-бета (LTBR) влияет на размножение, активность и устойчивость Т-клеток, а также на выработку ими цитокинов, которые играют большую роль в противоопухолевом действии препаратов. Авторы исследования полагают, что полученные ими результаты являются важным шагом для разработки CAR-T терапии нового поколения.

Публикуется по: <https://www.worldpharmanews.com> от 16.03.2022



О.В. Шаповалова ,
Н.П. Неугодова 

Методология расчета нормы предельного содержания бактериальных эндотоксинов

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

РЕЗЮМЕ

При составлении нормативной документации на лекарственные препараты для парентерального применения и фармацевтические субстанции, предназначенные для их производства, обязательным требованием является включение показателя, нормирующего содержание пирогенных примесей, — «Бактериальные эндотоксины». Экспертами ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России предложены рекомендации по расчету и выбору нормы предельного содержания бактериальных эндотоксинов, что позволит заявителям включать в проекты нормативных документов корректные требования по предельному содержанию бактериальных эндотоксинов в лекарственных средствах. Представленный алгоритм выбора норм позволит в максимальной степени снизить риск пирогенных реакций у пациентов и обеспечить безопасность применения лекарственных препаратов.

Ключевые слова: норма предельного содержания; бактериальные эндотоксины; пирогенная доза; максимальная доза; режим дозирования

Для цитирования: Шаповалова О.В., Неугодова Н.П. Методология расчета нормы предельного содержания бактериальных эндотоксинов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2022;12(1):110–111. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-110-111>

O.V. Shapovalova ,
N.P. Neugodova 

Methodology for Calculating Bacterial Endotoxin Limits

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

ABSTRACT

Product specification files for parenteral medicines, as well as for active ingredients used in their production, have to include the “Bacterial endotoxins” parameter that controls the content of pyrogenic impurities. The experts of the Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation proposed recommendations for calculation and selection of the bacterial endotoxin limit, which will help applicants to include correct requirements for bacterial endotoxin limits in their product specification files. The proposed algorithm for the selection of bacterial endotoxin limits will make it possible to reduce the risk of pyrogenic reactions in patients and ensure safe use of medicinal products.

Key words: limit; bacterial endotoxins; pyrogenic dose; maximum dose; dosing regimen

For citation: Shapovalova O.V., Neugodova N.P. Methodology for calculating bacterial endotoxin limits. *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):110–111. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-12-1-110-111>

«Бактериальные эндотоксины» — один из важнейших показателей качества, определяющий безопасность применения лекарственных препаратов для парентерального применения, благодаря нормированию содержания пирогенных примесей. Норма предельного содержания бактериальных эндотоксинов (ПС БЭ) для лекарственных препаратов, а также фармацевтических субстанций рассчитывается по формуле, приведенной в ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины», с учетом рекомендации дозирования готовой лекарственной формы:

$$\text{ПС БЭ} = K/M, \quad (1)$$

где ПС БЭ — предельное содержание бактериальных эндотоксинов, ЕЭ/мг, ЕЭ/мл, ЕЭ/МЕ или ЕЭ/ЕД; K — пороговая пирогенная доза из расчета на единицу массы тела человека, которая при данном пути введения не вызывает пирогенной реакции, ЕЭ/кг/ч. Для всех парентеральных путей введения, за исключением интратекального, K составляет 5 ЕЭ на 1 кг/ч. При интратекальном пути введения K составляет 0,2 ЕЭ на 1 кг/ч;

M — максимальная доза лекарственного препарата для данного пути введения, которая вводится в течение часа человеку со средней массой тела 70 кг и выражается мг, мл, ЕД или МЕ. Для выбора значения величины M руководствуются инструкцией по медицинскому применению препарата. Для фармацевтической субстанции также рассматривают инструкцию по медицинскому применению препарата, для производства которого используется данная субстанция.

Для отдельных групп лекарственных препаратов предусмотрены другие формулы расчета нормы ПС БЭ.

Для радиофармацевтических препаратов, вводимых парентерально:

$$\text{ПС БЭ} = 175 \text{ ЕЭ}/V, \quad (2)$$

для радиофармацевтических препаратов, вводимых интратекально:

$$\text{ПС БЭ} = 14 \text{ ЕЭ}/V, \quad (3)$$

где V — максимальная рекомендованная доза, мл. Для препаратов, дозирование которых осуществляется из расчета на единицу площади поверхности тела человека при расчете по формуле (1) величина $K = 100 \text{ ЕЭ}/\text{м}^2$, при этом дозу M выражают в мг/м².

Проекты НД, представляемые заявителями на экспертизу, в ряде случаев содержат некорректные требования к содержанию БЭ, несмотря на наличие формул расчета ПС БЭ

в ОФС.1.2.4.0006.15. Так, например, заявленная норма ПС БЭ может не соответствовать уровню безопасного применения препарата или, наоборот, в проектах НД регламентируются более строгие требования к качеству, в результате чего могут возникнуть сложности при определении БЭ из-за наличия мешающих факторов. Наиболее часто это объясняется неправильной интерпретацией дозирования препарата. Поэтому необходимо выполнить следующий алгоритм действий:

- 1) провести анализ режима дозирования лекарственного препарата;
 - 2) провести анализ режима дозирования аналогичных препаратов и информации, приведенной в типовых клинко-фармакологических статьях (ТКФС) государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС);
 - 3) сравнить полученные расчетные величины с нормами ПС БЭ на аналогичные лекарственные средства, указанными в ведущих фармакопеех мира (Европейская фармакопея, фармакопея США, Великобритании и Японии), а также в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ);
 - 4) выбрать и утвердить нормы ПС БЭ с наименьшим значением как наиболее надежный критерий контроля качества лекарственного средства.
- В качестве примера рассмотрим субстанцию цефтриаксон и лекарственный препарат, содержащий это же активное вещество. С учетом режима дозирования данного лекарственного препарата («При бактериальном менингите у детей начальная доза составляет 100 мг/кг 1 раз в сутки») норма должна составлять — «не более 0,05 ЕЭ/мг цефтриаксона» ($K/M = 5 \text{ ЕЭ}/\text{кг} : 100 \text{ мг}/\text{кг} = 0,05 \text{ ЕЭ}/\text{мг}$). В Фармакопее США для субстанции и препарата предусмотрено содержание БЭ «не более 0,2 ЕЭ/мг цефтриаксона». В данном случае следует установить норму, рассчитанную с учетом максимальных доз. Такое же значение согласовано и принято в ГФ РФ (ФС.2.1.0213.18 «Цефтриаксон натрия»).
- Представленный алгоритм позволит в максимальной степени снизить у пациентов риск побочных реакций, вызванных пирогенными примесями, и гарантировать безопасность применения лекарственных препаратов.

По всем вопросам просим пользоваться формой обратной связи, размещенной на сайте

<https://www.regmed.ru/feedback.aspx>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Шаповалова Ольга Владимировна, ведущий эксперт лаборатории фармакологии, канд. фарм. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>

Неугодова Наталия Петровна, начальник лаборатории фармакологии, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Olga V. Shapovalova, Leading expert of the Pharmacology Laboratory, Cand. Sci. (Pharm.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>

Natalya P. Neugodova, Head of the Pharmacology Laboratory, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Ведомости Научного центра экспертизы
средств медицинского применения

Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств

